

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD
DE NEWCASTLE EN PATOS CRIOLLOS (*Cairina
moschata*) DE TRASPATIO”**

TESIS

Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Roxana Aly Buendía Endara

Lima-Perú

2014

DEDICATORIA

*A mis padres, Ruth y Marcos, por su apoyo,
consejos, comprensión y amor incondicional.*

*A todos aquellos que participaron directa o
indirectamente en la elaboración de esta
tesis.*

AGRADECIMIENTOS

*A la Facultad de Medicina Veterinaria de la
Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*

*A mis padres y hermanos, porque siempre
me apoyan en cada una de mis metas
trazadas.*

*Agradecimiento sincero a los Drs. Rosa González, John
Guzmán, Giovanna Cribillero y muy especialmente a mi
asesora de tesis, la Dra. Eliana Icochea, por su
paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento.*

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE APÉNDICE	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Orden Anseriformes	3
2.2 Importancia económica y en Salud Pública	4
2.3 Definición	5
2.4 Historia	6
2.5 Etiología	9
2.5.1 Clasificación	9
2.5.2 Morfología	10
2.5.3 Características del genoma viral	10
2.5.4 Propiedades biológicas del virus	12
2.5.5 Replicación Viral	13
2.5.6 Clasificación de las cepas	14
2.5.6.1 Antigenicidad	15
2.5.6.2 Patogenicidad	16

2.6	Epidemiología	17
2.6.1	Susceptibilidad de las aves domésticas	19
2.6.2	Distribución	22
2.6.3	Trasmisión	25
2.7	Presentación Clínica	28
2.7.1	Periodo de Incubación	28
2.7.2	Signos clínicos	29
2.7.3	Patología	32
2.8	Diagnóstico	35
2.8.1	Aislamiento e identificación viral	36
2.8.2	Técnicas moleculares	38
2.8.3	Pruebas serológicas	41
2.8.4	Pruebas de patogenicidad	43
2.9	Control y bioseguridad	44
2.10	Enfermedad de Newcastle y la crianza de traspatio	45
2.11	Enfermedad de Newcastle en el Perú	49
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1	Lugar y tiempo de estudio	52
3.2	Tamaño de muestra	52
3.3	Animales	53
3.4	Colección y Recepción de muestras	53
3.5	Procesamiento de las muestras	54
3.6	Análisis estadístico	56
IV.	RESULTADOS	57
V.	DISCUSIÓN	60

VI.	CONCLUSIONES	65
VII.	LITERATURA CITADA	66
VIII.	APÉNDICE	85

ABREVIATURAS

ENC	Enfermedad de Newcastle
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
SENASA	Servicio nacional de Sanidad Agraria
vENC	Virus de la enfermedad de Newcastle
Proteína F	Proteína F
Proteína M	Proteína M
HN	Hemaglutinina neurominidasa
HA	Hemaglutinación
IH	Inhibición de la hemaglutinación
PMAV-1	Paramixovirus Aviar tipo I
PPMV-1	Paramixovirus Aviar Tipo I Paloma
ICPI	Índice de patogenicidad intracerebral
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
VVND	Enfermedad de Newcastle Velogénico Viscerotropico
NDNV	Enfermedad de Newcastle Velogénico Neurotropico
SPF	Specif Pathogen Free (Libre de patógenos específicos)
APA	Asociación Peruana de avicultura

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle (PMAV-1) en patos de traspatio en dos provincias del departamento de Lima (Huaral y Huaura), en el departamento de Lima. Seiscientas muestras de hisopado cloacal de patos de traspatio fueron colectadas desde febrero hasta julio del 2012. Dichas muestras se analizaron mediante aislamiento viral en huevos embrionados SPF. La presencia del virus de Newcastle fue determinada por la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo, y confirmada mediante la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación utilizando anticuerpos específicos. El total de las muestras analizadas en este estudio fueron negativas a la presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle. La técnica de evaluación de riesgo mediante simulación de Monte Carlo (programa @Risk) indico que la probabilidad de encontrar el vENC en patos de traspatio fue de 0.1% con un intervalo de confianza de 0.004 a 0.6%. La prevalencia encontrada fue muy baja para considerar a estas aves como posible fuente de infección hacia las aves domésticas.

Palabras clave: virus de la enfermedad de Newcastle, patos de traspatio, aislamiento viral.

ABSTRACT

The objective of the study was to detect the presence of the Newcastle disease virus (PMaV-1) in backyard ducks in two provinces of Lima (Huaral and Huaura). Cloacal swabs samples (n=600) from backyard ducks were collected from February to July 2012. Samples were analyzed by virus isolation in SPF embryonated chicken eggs. The presence of Newcastle Virus was determined by the hemagglutination activity of the allantoic fluid and confirmed by testing hemagglutination inhibition using specific antibodies. The 100% of the samples were negative. The technique of risk assessment using Monte Carlo Simulation (programa @Risk) indicated that the probability of finding viruses of Newcastle disease in backyard ducks was 0.1% with a confidence interval of 0.004% to 0.6%. The prevalence was too low for considering these birds as a possible source of infection toward domestic birds.

Key words: Newcastle disease virus, backyard ducks, viral isolation.

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Número de muestras colectadas y distrito de procedencia.	48
Cuadro 2. Número de muestras colectadas, el distrito de procedencia y resultados de la prueba de hemaglutinación (HA).	52
Cuadro 3. Resultados de la prueba de Inhibición de la hemaglutinación usando suero específico al Paramixovirus Aviar Tipo-1.	53

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución de la probabilidad de prevalencia del vENC en patos de traspatio, en las provincias de Huaral y Huaura, con intervalos de confianza del 95%.	54

LISTA DE APÉNDICES

	Pág.
APÉNDICE 1. Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (OIE, 2009).	76

I. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Newcastle (ENC) es una de las principales enfermedades de importancia económica en la avicultura mundial; la naturaleza y magnitud de la enfermedad varía entre países y especies (King, 1999). Aunque aparenta estar controlada en la mayoría de países, frecuentemente se presentan brotes que causan serias pérdidas económicas constituyendo una amenaza para la industria avícola (Alexander, 2001; Wakamatsu *et al.*, 2006; OIE, 2008). La ENC está incluida en la lista única de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (OIE, 2005) y es de notificación obligatoria a este organismo y a las autoridades sanitarias locales (Martins, 2003).

El impacto económico que tiene la ENC es enorme, no solo como consecuencia de los brotes, también por las medidas de control; incluyendo la vacunación, gastos en análisis y pruebas que se requieren para mantener el estatus óptimo para la comercialización de aves y subproductos (Alexander, 2003). Muchos países dependen de la crianza de aves de traspatio para aportar una importante ración de proteína de origen animal (huevos o carne). El impacto de la ENC no debería ser medido exclusivamente en las pérdidas comerciales directas, ni en el incremento del porcentaje de mortalidad (Villegas y Avellaneda, 1995), sino también por la pérdida del potencial socioeconómico (Alexander, 2003).

La utilización casi universal de vacunas contra la ENC en la avicultura comercial a nivel mundial hace casi imposible la determinación de la verdadera distribución geográfica de la enfermedad (Alexander, 2003). El monitoreo internacional de la ENC es llevado a cabo por instituciones como la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OIE, pero las figuras producidas podrían no ser representativas de la verdadera distribución del vENC (virus de la Enfermedad de Newcastle) (Alexander, 2003) ya que en algunos países o áreas la enfermedad no se reporta del todo o solo se reporta cuando

sucede en aves comerciales, ignorando la presencia del vENC en aves de crianza no tecnificada como son las aves de traspatio (Alexander *et al.*, 2004).

Además de las especies aviares domésticas, se ha demostrado la infección natural o experimental con el vENC en al menos 250 especies (Carter *et al.*, 2005). Los pollos, gallos y gallinas son altamente susceptibles, mientras que los patos y gansos pueden encontrarse infectados y mostrar signos clínicos leves o ninguno, incluso con cepas letales para pollos (Alexander, 2003; Alexander, 1998). Cabe resaltar, que los portadores inaparentes, como son las aves acuáticas y domésticas, liberan intermitentemente el virus (Baez, 1994) actuando como portadores y fuentes de infección para la avicultura comercial (Tadesse *et al.*, 2005). Por lo tanto, en los programas de erradicación de la ENC es imperativo el control de la diseminación de la infección a través de estas aves (Ananth *et al.*, 2008).

En el Perú la ENC fue diagnosticada por primera vez en el año 1951 y hasta la actualidad no ha podido ser erradicada. La Asociación Peruana de Avicultura (APA) trabaja de la mano con el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) con el principal objetivo de declarar al Perú como país libre de la enfermedad (SENASA, 2004). Los principales estudios de vigilancia en nuestro país, han sido realizados en aves silvestres, exóticas y de riña, no existiendo ningún estudio que haya evaluado la situación sanitaria de los patos de crianza casera en el país. De otro lado se conoce que aun con cepas altamente patogénicas, en estas aves la infección es de tipo subclínico, pero tienen la capacidad de eliminar el virus intermitentemente, por lo tanto fue necesario realizar el presente estudio que tuvo como objetivo evaluar la presencia del vENC (virus de la enfermedad de Newcastle) en patos de traspatio de las provincias de Huaral y Huaura, con el fin de contribuir a la vigilancia epidemiológica de la Enfermedad de Newcastle en esta poblaciones de aves en el el Perú.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Orden anseriformes

Las aves del orden Anseriforme comprenden 162 especies repartidas en tres familias: *Anhimida*, *Anseranatidae* y *Anatidae* que se encuentran distribuidas a nivel mundial. El pato criollo (*Cairina moschata*) conocido también como pato americano, pato mudo o pato de Berbería pertenece al orden Anseriformes, género *Cairina* y es una especie única de las selvas húmedas sudamericanas, presenta gran variabilidad genética, encontrándose animales indistinguibles de la forma silvestre.

Los colores más comunes son, diferentes tonos de marrón, gris, blanco, y sus combinaciones. El dimorfismo sexual es muy acentuado, el peso de las hembras (2.2 – 2.5 Kg) corresponde al 55% del peso del macho (4.2 – 4.5 Kg) éstos poseen un pico ancho, sobre el cual presenta una serie de carnosidades de color rojo llamadas carúnculas (Avilez y Camiruaga, 2006). Entre sus características zootécnicas resaltantes están su rusticidad, resistencia a las enfermedades, alta prolificidad, precocidad en el engorde y capacidad para aprovechar gran diversidad de alimentos, entre los que se encuentran los forrajes verdes (Narvaiza, 2008).

La domesticación y usos de *Cairina Moschata* en el pasado se pueden identificar en representaciones en cerámica, piedra e iconografías, así como plumas y restos óseos registrados en la secuencia cultural precolombina y en relatos de crónicas que mencionan el uso de la carne de pato seca y hecha polvo “zahumerio” (Ángulo, 1998).

Actualmente, está muy difundido en los países ecuatoriales de África y de Asia, particularmente en el sudeste asiático, en donde es criado para la explotación de su carne y huevos. En Sudamérica su crianza intensiva, no está muy desarrollada; sin embargo, en comunidades campesinas latinoamericanas representa una valiosa fuente de proteínas en los

países de bajos ingresos y con déficit de alimentos que comúnmente lo usan para autoconsumo (Narvaiza, 2008).

2.2 Importancia Económica y en Salud Pública

La emergencia de la ENC en un territorio trae consigo de manera inmediata enormes pérdidas como consecuencia de la elevada mortalidad en las aves afectadas, el sacrificio de las aves enfermas o expuestas a la enfermedad. Incrementándose las pérdidas por las medidas de control, indemnización a los avicultores; los programas de vigilancia y las restricciones comerciales internacionales.

Entre los gastos de los programas de vigilancia, destaca el elevado número de controles serológicos que se han de realizar en las zonas afectadas y en riesgo. Entre los gastos derivados del control de la enfermedad están considerados, el sacrificio preventivo de granjas no afectadas, la mejora de los niveles de bioseguridad, la destrucción de cadáveres y del material potencialmente infectado, la limpieza y desinfección de granjas, el control de movimiento de aves y/o productos avícolas y la vacunación. Las restricciones comerciales impuestas por la OMC (Organización Mundial del Comercio) y la OIE en los países que sufren algún brote, consiste en la prohibición de exportar aves vivas y productos avícolas desde estos países.

Un ejemplo de la enorme repercusión de esta enfermedad, son los más 7,5 millones de aves que fueron eliminadas en la epidemia del Reino Unido en el año 1997 (Alexander *et al.*, 1998), la italiana en el año 2000 (Capua *et al.*, 2002) y la de EEUU (Estados Unidos de América) en el año 2002-2003 (Hietala *et al.*, 2004). Mientras que la eliminación masiva de aves en los países desarrollados solo provoca pérdidas económicas, en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo, epidemias de esta enfermedad compromete una de las fuentes de proteínas más baratas e importantes.

Las restricciones comerciales impuestas en los países afectados por la ENC, son responsables de gran parte de las pérdidas económicas indirectas generadas en las epidemias. Algunos ejemplos de ello, fueron las prohibiciones comerciales a EEUU durante la epidemia de la ENC en 2002-2003, que tuvo un impacto de 121 millones de dólares (Hietala *et al.*, 2004).

Además de las repercusiones económicas se ha de tener en cuenta el carácter zoonótico de esta enfermedad. El virus es capaz de producir en seres humanos síntomas oculares como conjuntivitis, o edema de párpados que suelen ser suaves y remiten sin dejar secuela, la infección también puede ser subclínica y pasar desapercibida (Capua y Alexander, 2004). Se ha presentado sobre todo en obreros de centros de beneficio de aves, personal de laboratorio y vacunadores. En un centro de beneficio de aves de Minnesota, EEUU, se describió 40 casos clínicos. Es posible que muchos de los casos esporádicos de conjuntivitis por el vENC no reciban atención médica, y si la reciben, no se realice un diagnóstico específico de laboratorio. En una evaluación serológica realizada al personal de una planta de beneficio de aves, se encontraron títulos altos a la prueba de neutralización en 64% del personal expuesto, sin que éste haya manifestado sintomatología (OPS, 2003).

2.3 Definición

La OIE definía (antes de 1999) a la ENC como la enfermedad producida por cepas del PMAV-1 significativamente más virulentas que las cepas lentogénicas utilizadas en vacunación (B1 y La Sota) (Villegas y Avellaneda, 1995; Hoerr, 2004). Actualmente la ENC se define como:

“La infección de las aves ocasionada por los paramixovirus aviares serotipo 1 (PAMV-1) que reúne por lo menos uno de los siguientes criterios de virulencia:

a. El virus tiene un Índice de Patogenicidad Intracraneal (ICPI) en pollos de un día de edad (*Gallus gallus*) de 0.7 o mayor.

b. Se ha demostrado en el virus la presencia de múltiples aminoácidos básicos (directamente o por deducción) en el Terminal C de la proteína F2 y fenilalanina en el lugar 117, el cual es el Terminal N de la proteína F1. El término “múltiples aminoácidos básicos” se refiere al menos a tres residuos de argininas o lisinas entre las posiciones 113 y 116.

La ENC ha sido conocida con diferentes nombres como pseudopeste aviar, pseudoplagia aviar, peste aviar, plaga aviar Coreana, enfermedad de Tetelo y neumoencefalitis aviar (Alexander, 2003) y es reconocida mundialmente como la primera plaga de los pollos (Maho *et al.*, 2000).

El vENC varía ampliamente tanto en el tipo como en la severidad de la enfermedad que produce, esta variación ha ocasionado algunos problemas en reconocer y diagnosticar a la enfermedad cuando se introduce a algún país o área y como consecuencia de su gran variación, desde las formas atípicas hasta las clásicas, a lo largo de su recorrido epidemiológico y por lo mismo, es muy importante tener la capacidad de distinguir entre un virus de baja virulencia y las formas más virulentas del vENC (Seal *et al.*, 2005).

2.4 Historia

La ENC ha ocurrido a lo largo de la historia en forma de pandemias. La primera documentada ocurrió en el sudeste asiático a mediados de los años 20, desde entonces, de manera muy lenta se expandió a lo largo del mundo. Hanson (1972) estimó que tardó más de 30 años para esparcirse a nivel mundial, siendo importante en la mayor parte de los países en los primeros años de los 60s (Docherty y Friend., 2001; Alexander, 2003; Brown y Alexander, 2003; Alexander *et al.*, 2004; Antillon, 2005). La difusión de aquella pandemia probablemente

fue confusa y lenta como resultado de las inusuales circunstancias que reinaban a consecuencia de la Segunda Guerra Mundial y el consiguiente trastorno comercial.

En marcado contraste, la segunda panzootia se inició en el Medio Oriente a finales de la década de los 60s y llegó a la mayoría de los países para el año 1973. La mayor velocidad de diseminación de esta panzootia podría haberse debido a que la industria avícola había sufrido una gran revolución, en donde se desarrolló una industria comercial de aves que paso de granjas pequeñas y privadas a granjas de gran tamaño en el marco de un considerable comercio internacional (Alexander, 2003) y en que la comercialización de alimentos para aves significó un mayor contacto entre granjas separadas por el movimiento de los camiones de reparto (Alexander *et al.*, 2004).

El transporte también se había desarrollado enormemente y las aves exóticas podían ser movidas fácil y rápidamente a todas partes del mundo (Alexander, 2001). La enorme comercialización de estas aves, las cuales involucraban transportes aéreos rápidos, se considera uno de los principales factores en la diseminación de la enfermedad. El serio efecto que tuvo esta segunda panzootia en las industrias avícolas en la mayor parte de los países, llevó al desarrollo de vacunas y programas que proveyeron una importante protección en las aves. Así mismo, la mayoría de países impusieron nuevas medidas de control para la importación de aves exóticas (Docherty y Friend, 2001; Alexander, 2003; Brown y Alexander., 2003; Antillon, 2005).

Alexander (2003), Brown y Alexander (2003) y Alexander *et al.* (2004) mencionan en base a evidencia antigénica y genética que probablemente se produjo la distribución mundial de un tercer virus virulento a finales de la década de los 70s. El inicio y diseminación de esta tercera panzootia es poco clara, se presume que debido al uso casi universal de las vacunas, especialmente de vacunas vivas, desde mediados de los años 70s, las aves podrían haber estado

protegidas contra la enfermedad, pero en la mayoría de los casos permitieron la replicación y diseminación del virus.

Mientras que, Liu *et al.* (2005), Jordan (1990) y Docherty y Friend (2001); indican que la tercera panzootia fue a causa del PMAV-1 que aparentemente se inició en el Medio Oriente y se diseminó a nivel mundial. El origen se estima a fines de la década de los 70s y estuvo presente durante la década de los 80s. Se incrimina a las palomas como las responsables de esta pandemia, siendo éstas las más afectadas, en donde el cuadro fue principalmente neurotrópico y entérico. En algunos países esta pandemia llegó a afectar también a pollos.

La cuarta panzootia ocurrió en los 80s, Alexander (2003), Brown y Alexander (2003) y Alexander *et al.*, (2004) consideran que los colúmbidos (palomas y cuculíes) cridados para carreras, exposiciones o con propósitos alimenticios, que fueron genéticamente ignorados como fuente potencial del vENC posibilitaron una rápida diseminación de la ENC a Europa y otras partes del mundo debido al contacto entre aves de competencia y ornamentales; y al gran comercio internacional con tales aves (Alexander, 1997). Factores importantes de esta pandemia fueron, la enorme población mundial de palomas mensajeras y de su elevada susceptibilidad a la infección por vENC, la mayoría permaneció sin ser vacunadas hasta finales de los 70s (Alexander, 2001).

En el año 1981, la diseminación ya había alcanzado Europa y en 1985 se había convertido en una verdadera pandemia, básicamente como resultado del contacto de aves en carreras y exposiciones y el amplio comercio internacional de estas aves. En muchos países afectados también se produjo una difusión de la enfermedad hacia palomas silvestres, como resultado del contacto con palomas mensajeras que fallaban en su retorno a casa.

La diseminación hacia los pollos ha sucedido en varios países, incluyendo Gran Bretaña en donde ocurrieron 20 brotes en pollos no vacunados en 1984 como resultado de la

contaminación del alimento a partir de palomas infectadas. El cuadro de la enfermedad en estas aves fue neurotrópico pero sin signos respiratorios (Alexander, 2003).

Medidas de control como la vacunación obligatoria de las aves que participaban en carreras y exhibiciones, fueron implantadas en muchos países. La enfermedad en palomas ha sido reconocida por más de dos décadas, pero aún parece permanecer enzoótica en palomas de carrera en muchos países, con diseminación regular a palomas salvajes y es considerada una amenaza constante para las aves de corral (Fehervari, 2000).

La mayoría de los focos que han tenido lugar en la Unión Europea (UE) en los últimos años se han producido en explotaciones domésticas. La última epizootia de la enfermedad en Europa se produjo en Dinamarca en el año 2002, en la cual se declararon 135 casos; de los cuales 126 fueron en explotaciones domésticas y 9 en explotaciones comerciales. Actualmente estudios seroepidemiológicos y el aislamiento viral han demostrado que la cepa velogénica del vENC es endémica en las poblaciones de aves de corral rurales (Spradbrow, 1993; Otim *et al.*, 2004, 2006).

2.5 Etiología

La enfermedad de Newcastle (ENC) está causada por cepas virulentas del paramixovirus aviar tipo 1 (PMAV-1), que es un serotipo del género *Avulavirus* perteneciente a la subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae* y orden *mononegavirales* (OIE, 2009).

2.5.1 Clasificación

Los paramixovirus procedentes de diferentes especies aviares se han clasificado mediante pruebas serológicas y análisis filogenéticos en diez subtipos, denominados PMAV-1 a PMAV-10 (Miller *et al.*, 2010); el vENC se ha denominado PMAV-1.

Análisis filogenéticos recientes, basados en el tamaño del genoma y en la secuencia del gen F y de la polimerasa, han señalado dos clases dentro del serotipo 1 del virus de Newcastle (Czegledi *et al.*, 2006). La mayoría de los virus notificados pertenecen a la clase I, mientras que la clase II incluye reportes de virus en aves acuáticas y en mercados de aves vivas en los Estados Unidos (Kim *et al.*, 2007b). Además el paramixovirus tipo I que afecta a las palomas (PPMV) se diferencia antigénicamente de los PMAV-1 clásicos por tener un patrón característico de reacción frente a Anticuerpos Monoclonales (MABs), lo que identifica como variante antigénica de PMAV-1.

2.5.2 Morfología

Los vENC son pleomórficos aunque generalmente adoptan una morfología esférica con un diámetro que oscila entre 100 a 150 nm. El peso molecular de la partícula viral es de 500×10^6 Da. El virión se encuentra rodeado de una envoltura con una doble capa lipídica derivada de la membrana de la célula hospedadora (Alexander, 1997).

Embebidas en la envoltura se encuentran dos glucoproteínas diferentes, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F), que aparecen como pequeñas espículas proyectadas desde la superficie de la membrana cuando son observadas con microscopio electrónico. La cápsida tiene simetría helicoidal y el genoma es ácido ribonucleico (ARN), no segmentado, de simple cadena y polaridad negativa (Westover, 2001; Pedersen *et al.*, 2004).

2.5.3 Características del genoma viral

Los paramixovirus característicamente consisten en una molécula de cadena simple de ARN. La longitud del genoma del vENC es de aproximadamente 15186 nucleótidos (De Leeuw y Peeters, 1999). Tiene seis genes NP, P, M, F, HN, L, en el orden 3'-5', que codifican a su vez para proteínas estructurales y no estructurales: la nucleoproteína (NP), la proteína fosforilada

(P), la ARN polimerasa dependiente (L), la proteína de la matrix (M), la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina-neurominidasa (HN) (Mebatsion *et al.*, 2003). Siendo las más importantes la hemaglutinina- neurominidasa (H/N) y la de fusión (F) que confieren al virus propiedades biológicas de hemaglutinación y fusión respectivamente.

El gen L tiene 6 regiones altamente conservadas consideradas esenciales para la actividad enzimática de la polimerasa. Su producto, la proteína L es la menos abundante en la partícula viral y en asociación con la proteína P constituyen la polimerasa viral activa (Wise *et al.*, 2004b).

La nucleoproteína (NP), codificada por el gen NP, es esencial para la replicación viral y las diferencias encontradas entre las proteínas NP de distintos aislados del virus pudieran tener un papel importante en la virulencia individual de las cepas (Seal *et al.*, 2002). Este gen es el primero y que más se transcribe durante el ciclo de multiplicación viral. Su proteína es la que se encuentra en mayor cantidad en la partícula viral y está estrechamente asociada con el ARN genómico formando la nucleocápsida (Seal, 2002; Wise *et al.*, 2004b). Asimismo, también están asociadas a la NP, la proteína fosforilada (P), y al ARN polimerasa ARN dependiente (L) y juntas forma la ribonucleoproteína.

Las proteínas HN y F están expuestas como protuberancias en la superficie de la envoltura del virión y son esenciales para iniciar la infección viral. La glucoproteína HN es la más grande de las moléculas glucoproteicas y posee actividad de hemaglutinina (HA) y de Neurominidasa (NA) (Murphy *et al.*, 1999). La actividad hemaglutinante de HN permite su unión a receptores específicos de membrana de las células huésped, incluidos glóbulos rojos (Kimball, 1990). Mediante su actividad neurominidasa la HN hidroliza el ácido salicílico terminal de glucoproteínas y glucolípidos permitiendo liberar las partículas virales de los receptores de las células hospedadoras, facilitando así la difusión del virus (Huang *et al.*, 2004). Los anticuerpos inducidos por estas glicoproteínas de superficie pueden ser detectados por

pruebas de Virus Neutralización (VN), Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) e Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) (Alexander, 2003).

La proteína F es responsable de la fusión de las membranas celulares y virales y por tanto, la entrada del virus al interior de la célula hospedadora (Morrison, 2003). Esta proteína es la principal determinante de patogenicidad del vENC (Collin *et al.*, 1993; Peeters *et al.*, 1999; Shengging *et al.*, 2002), su actividad es independiente del pH y como resultado de ello las células infectadas que expresan esta proteína viral en su superficie se fusionan con las células adyacentes formando células gigantes multinucleadas, efecto característico de este virus cuando se multiplica en cultivos celulares (Morrison, 2003). La proteína F es sintetizada como un precursor inactivo, F0, que es escindido proteolíticamente para generar dos polipéptidos, F1 y F2, mediante la acción de proteasas celulares (Ogasawara *et al.*, 1992). Ahora se tiene una gran evidencia de que el punto de escisión de F0 es un importante determinante de la virulencia (Peeters *et al.*, 1999).

2.5.4 Propiedades biológicas del virus

2.5.4.1 Actividad hemaglutinante

La capacidad de aglutinar glóbulos rojos se debe a la unión de la proteína Hemaglutinina-Neurominidasa (HN) con los receptores de los eritrocitos. Esta propiedad y la inhibición específica de la aglutinación por medio de antisueros han demostrado ser importantes herramientas para diagnóstico de la enfermedad (Alexander, 2003).

El vENC aglutina células de anfibios, reptiles y aves en general; células rojas humanas, de ratones y de cuyes; pero la capacidad de aglutinar células de bovinos, caprinos, ovinos, porcinos y equinos depende de la cepa del vENC. Para pruebas de hemaglutinación (HA), por lo

general se utilizan eritrocitos de pollos; siendo los de pavos los que trabajan mejor en la prueba de hemaglutinación en aislamientos ocasionales, como el caso de los cormoranes (King, 1999).

Otros paramixovirus aviares también tienen la capacidad de aglutinar un amplio espectro de glóbulos rojos, esto dependerá tanto del serotipo como del virus aislado. Los paramixovirus pueden aglutinar otras células además de glóbulos rojos si cuentan con los receptores adecuados (Alexander, 2003). Cabe mencionar que no solo otros paramixovirus aviares pueden tener actividad hemaglutinante, sino que los Orthomyxovirus, como el virus de la Influenza Aviar también la tienen (Carter *et al*, 2005).

2.5.4.2 Actividad de la Neurominidasa

La presencia de esta enzima en la superficie de la envoltura del virión, provoca la elusión gradual de los glóbulos rojos aglutinados. Su función en la replicación es desconocida pero al parecer ésta tiene como función remover los receptores virales de la célula huésped, previniendo la adhesión de las partículas virales liberadas y el agrupamiento viral (Alexander, 2003).

2.5.4.3 Fusión celular y hemolisis

La adhesión a los receptores durante la replicación es seguida por la fusión de la membrana viral con la membrana celular, lo cual podría resultar en la fusión de una o más células (similar a la formación de sincitios que ocurre cuando las partículas virales salen por gemación de las células). Al momento de la fusión de la membrana viral con los eritrocitos, usualmente se produce lisis de la membrana rígida de los glóbulos rojos (Alexander, 2003).

2.5.5 Replicación viral

El paso inicial es la adhesión del virus a los receptores celulares, la cual esta mediada por el polipéptidos HN, luego se realiza la fusión de la membrana viral con la membrana celular por acción de la proteína de fusión (proteína F), de esta manera, el complejo nucleocápside ingresa a la célula y resulta en el efecto citopático característico de formación sincitial (Jordan, 1990).

La replicación intracelular se realiza por completo en el citoplasma. Debido a que el ARN viral tiene sentido negativo, la ARN-polimerasa dirigida por el ARN viral debe producir transcriptasas complementarias de sentido positivo para que puedan actuar como ARN mensajeros y así puedan utilizar el mecanismo celular, habilitando la traducción a proteínas y genomas virales. La proteína F es sintetizada como un precursor no funcional, F0, que requiere ser cortada en F1 y F2 por medio de proteasas de la célula huésped. (Alexander, 2003).

Las proteínas virales sintetizadas dentro de la célula infectada son transportadas a la membrana celular. Sigue el alineamiento de la nucleocápside en las cercanías de las regiones modificadas de la pared celular, las partículas virales son eliminadas por gemación de la superficie celular (Alexander, 2003) y por lo tanto el envolvimiento del virus ocurre gracias a la membrana lipoproteica de la célula infectada (Jordan, 1990).

2.5.6 Clasificación de las Cepas

El objetivo más importante en la caracterización de los virus es la agrupación de virus similares (Alexander, 2003). Para el vENC, la distinción entre virus de alta y baja virulencia en pollos o, tal vez entre virus enzoóticos y epizoóticos (Alexander, 2003).

Las pruebas de patogenicidad son marcadores útiles e importantes guías para los

aislamientos. Cepas con la misma virulencia no indican enlaces epidemiológicos. Algunas propiedades biológicas virales no relacionadas han demostrado variar entre distintas cepas y aislamientos, y estas propiedades han servido para caracterizar y agrupar las cepas aisladas (Alexander, 2003).

2.5.6.1 Antigenicidad

Se ha podido demostrar que existen variaciones antigénicas menores entre diferentes cepas y aislamientos del vENC mediante la técnica de VN o difusión en agar gel. Sin embargo, para objetivos prácticos los aislamientos de vENC han sido considerados como un único grupo con antigenicidad homogénea (Alexander, 2003).

Durante muchos años se consideró que todas las cepas y aislamientos del vENC formaban un grupo serológicamente homogéneo y esto sirvió de base para los procedimientos de vacunación utilizados en la mayoría de países. Sin embargo, el uso de técnicas serológicas más precisas, como el uso de MABs, han demostrado que existen variaciones antigénicas importantes entre diferentes cepas del vENC. Esta diferenciación ha sido de mucha ayuda en el entendimiento de la epidemiología de la ENC (Jordan, 1990).

La técnica de MABs proporciona un nuevo acercamiento a la diferenciación antigénica de las cepas y aislamientos del vENC. Los MABs pueden detectar pequeñas variaciones en antigenicidad, tales como el cambio de un simple aminoácido en el epítipo hacia el cual el anticuerpo está dirigido. Debido a ello, se puede diferenciar no solo entre cepas, sino también entre subpoblaciones virales. Los MABs se han utilizado en algunas investigaciones para diferenciar entre virus específicos, por ejemplo, diferenciando las cepas vacunales comunes, Hitchner B1 y La Sota y para diferenciar virus vacunales de virus de áreas epizooticas; y se pudo confirmar que la panzootia en palomas fue solo por causa de una variante del vENC. Durante la epizootia de ENC en Gran Bretaña en 1984, la rápida detección del PPMV

(Paramixovirus Aviar Tipo 1 de paloma) permitió un seguimiento temprano de la fuente de infección hacia la contaminación del alimento, pudiéndose así, controlar la enfermedad (Alexander, 2003).

2.5.6.2 Patogenicidad

Los virus de la ENC, se distinguen entre virus de alta y baja virulencia en pollos, o virus enzoótico y epizoóticos (Alexander, 2003). La virulencia de las cepas del vENC varía considerablemente según el huésped y aparentemente es dependiente de epítomos y el estatus enzimático del huésped (Gerlach, 1994). Los pollos son altamente susceptibles, mientras que los patos y gansos pueden encontrarse infectados y mostrar signos clínicos leves o ninguno, incluso con cepas letales para pollos (Alexander, 2003; Alexander, 1998). Mediante la inoculación de cepas altamente virulentas del vENC se demostró que la susceptibilidad varía entre pollos, pavos SPF (libres de patógenos específicos), pavos comerciales y palomas (Wakamatsu *et al.*, 2004).

Otros factores influyentes son la edad de la aves (más jóvenes sufren procesos más agudos), condiciones ambientales, vía y dosis de inoculación (aves infectadas por las vías naturales: nasal, ocular y oral desarrollan la infección respiratoria, en cambio las vías de infección intramuscular, intravenosa e intracerebral favorece la presencia de signos neurológicos) (Alexander, 1997). Se ha postulado que la secuencia de aminoácidos en el lugar de división de la proteína F es el mayor determinante de virulencia del virus. Sin embargo el rol de otras proteínas virales aún es desconocido (Peeters *et al.*, 1999).

La determinación de la virulencia de los aislados del vENC, puede ser realizada mediante secuenciación nucleótida y deducción de la secuencia de aminoácidos en el punto de corte de la proteína F, así como por pruebas de laboratorio “*in vivo*”. El primer intento en distinguir o agrupar cepas virales en el laboratorio por técnicas “*in vivo*”, fue al agrupar las

cepas del vENC según el tiempo letal promedio para el embrión (MDT) transcurrido post-inoculación en huevos de pollo que puede variar entre menos de 50 horas hasta más de 100 horas (Alexander, 2003; Carter *et al.*, 2005). Otras pruebas diseñadas para diferenciar cepas usan la evaluación directa de signos clínicos o las muertes inducidas en aves infectadas. Dichas evaluaciones permiten la cuantificación en base a la designación de puntaje de acuerdo al grado de severidad y el cálculo de un índice de patogenicidad.

Las pruebas más utilizadas son el Índice de Patogenicidad Intracerebral (ICPI) y el Índice de Patogenicidad Endovenosa (IVPI) en pollos de 6 semanas de edad. En los EEUU, se hace una distinción importante entre el virus velogénico viscerotrópico y otras cepas velogénicas para lo cual se utiliza la prueba de Patogenicidad por Inoculación Intracloacal (Alexander, 2003). Los valores obtenidos, proveyeron una guía sobre la enfermedad producida en pollos infectados que terminaron siendo aplicados como: virulencia alta, virulencia moderada y virulencia baja, independientemente del método de evaluación (Alexander, 2003).

2.6 Epidemiología

El vENC ha infectado cerca de 250 especies de aves (Carter *et al.*, 2005), que pertenecen a 27 de los 50 Órdenes que existen, de modo que pueden servir de reservorio del virus para la diseminación de la enfermedad (Brown y Alexander, 2003).

La epidemiología del PMAV-1 está comprendida de forma incompleta, todas las aves son susceptibles a la infección, aunque el grado de la enfermedad varía de una especie a otra y en función de la cepa viral. Siendo las aves acuáticas (*Orden Anseriformes*) las más resistentes, y posible reservorios de virus lentogénicos (Kim *et al.*, 2007a; Sakai *et al.*, 2007; Rovid *et al.*, 2010), que podrían volverse más virulentos después de establecerse en aves de corral. Se ha mencionado que este virus posee la capacidad de adaptarse a nuevos huéspedes a los que no solo infecta sino que puede causar mortalidades considerables (Estudillo, 2000).

Aves acuáticas muestran pocos o ningún signo clínico, incluso tras la infección con cepas virulentas del vENC (Hanson *et al.*, 2005) y si bien se infectan y mayormente no presentan signos clínicos (Kitching, 2004), si seroconvierten. En un estudio realizado en Alemania con 262 muestras de aves silvestres de 26 especies diferentes, se obtuvo 8.4% de aves positivas a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación aun cuando todas estuvieron aparentemente sanas al momento del muestreo (Ziedler y Hlinak, 1993). Sin embargo, se ha visto excepciones donde estas aves mostraron índices de mortalidad elevados (Docherty y Friend, 2001).

Aislamientos de cepas patógenas se realizó en brotes ocurridos en Canadá en 1975 y 1990, donde se observó alta mortalidad y signos neurológicos en cormoranes (Heckert, 1996). Hasta 1990, la ENC raramente había sido reportada como causa de muerte en aves silvestres, hecho que cambio luego del verano de 1990 y 1992, en que se produjeron brotes que causaron la muerte (hasta de un 90%) de gran cantidad de cormoranes, pelicanos y gaviotas en Canadá y EEUU (Docherty y Friend 2001). En brotes ocurridos en Turquía, Finlandia, Suecia y Chipre durante los años 2004; y en Francia y Bulgaria en el año 2005; la fuente probable de infección fueron aves silvestres o migratorias (OIE, 2005).

Las aves psitácidas han introducido el PMAV-1 en aves de corral, en algunos brotes. Los primeros informes sugerían que cepas virulentas podrían ser endémicas en psitácidas silvestres, ahora se cree que estas se infectan después de su captura. Recientemente en la India, se realizó la caracterización biológica y molecular de aislamientos del vENC en aves silvestres criadas como mascotas (paloma, perico, loro y periquito) en donde todas las cepas fueron identificadas como velogénicas (Senthuran *et al.*, 2005). Los PMAV-1 lentogénicos o mesogénicos son endémicos en las poblaciones de palomas, y pueden ser más virulentos si entran y ciclan, en aves de corral (Rovid *et al.*, 2010).

Las aves silvestres y otros animales exóticos sin duda alguna han contribuido a la diseminación de la enfermedad, pero hasta el momento su rol exacto no ha sido evaluado. El conocimiento de las especies que tras ser infectadas con el vENC son más susceptibles a mostrar signos de enfermedad, y las que, por el contrario, son capaces de eliminar virus de la ENC sin mostrar signos clínicos, tiene un enorme valor para el análisis del riesgo que cada especie impone tanto en la introducción, como en el mantenimiento de la enfermedad en un territorio (Sánchez y Vizcaíno, 2011).

Esperón *et al* (2014) evaluó el rol de las aves sinantrópicas y silvestres. Se recolectaron un total de 296 sueros de diferentes especies aviares: palomas domésticas (*Columba livia*), patos híbridos (*Anas sp.*), gansos domésticos (*Anser anser domesticus*) y cigüeñas blancas (*Ciconia ciconia*). Se encontraron títulos de anticuerpos contra el virus de Newcastle en el 56.3% de los gansos domésticos, en el 42.9% de las palomas y en el 30.4% de los patos híbridos. También se encontraron anticuerpos para otros paramyxovirus aviares (-3, -4, -6, -7, -8, -9).

2.6.1 Susceptibilidad de las aves domésticas al vENC

La mayoría de la información disponible sobre la ENC se refiere a aves comerciales, principalmente pollos y gallinas. Todas las aves domésticas son susceptibles de ser infectadas con el vENC. Sin embargo, la manifestación de la enfermedad varía enormemente con la cepa viral, y la especie afectada. Otros factores como la edad, las condiciones ambientales, y las infecciones concomitantes con otros microorganismos también pueden variar la susceptibilidad de las especies a la enfermedad (Alexander, 2000). Las aves jóvenes y aquellas criadas bajo condiciones de confinamiento son las más susceptibles y desarrollan cuadros más drásticos, las más resistentes parecen ser las aves acuáticas (Alexander, 2003).

A pesar de la variabilidad existente, los estudios realizados a nivel experimental y las observaciones de campo, indican que los pollos son altamente susceptibles a la enfermedad. Los

pavos son menos propensos a desarrollar síntomas severos (Alexander, 2000; Capua *et al.*, 2002; Wakamatsu *et al.*, 2006). Los patos y los gansos son considerados reservorios naturales del vENC, y presentan generalmente infecciones inaparentes (muestran pocos o ningún signo clínico después de la infección con el virus de Newcastle), incluso con cepas letales para pollos (Shengqing *et al.*, 2002; Stanislawek *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2009). En China desde los años 90, han sido aisladas cepas (genotipos VI y VII) (Rovid *et al.*, 2010) y en los últimos años un gran número de cepas del vENC de diferente virulencia han sido aislados de patos enfermos y clínicamente sanos (Kim *et al.*, 2007a; Lee *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010) trayendo nuevos problemas en el control de la ENC.

La mayoría de ellos pertenecientes a la clase I y de baja virulencia; poco se sabe acerca de su diversidad genética o potencial para causar enfermedad en patos domésticos debido a la falta de datos de vigilancia en estas especies (Alexander, 2003; Liu, 2007).

Para ampliar el conocimiento sobre la epidemiológica de la ENC, en Corea fueron evaluadas cepas del vENC aisladas de patos domésticos, en base a pruebas de patogenicidad 13 cepas fueron clasificadas como lentogénicas y una, como velogénica (Lee *et al.*, 2009). Un estudio completo utilizando enfoques virológicos y serológicos fue realizado en patos domésticos (*Anas platyrhynchos*) en Nueva Zelanda para evaluar PMAVs. Fueron aislados 27 cepas de Paramixovirus aviares que se caracterizaron como sigue: 10 como PMAV-1 y 17 como PMAV-4. En otro estudio, se examinaron 315 muestras de suero de patos domésticos para evaluación de anticuerpos, y se obtuvieron los siguientes resultados: PMAV-8 (56%), el PMAV-4 (51,7%), el PMAV-9 (15,9%), el PMAV-2 (13,3%) y el PMAV-3 (6%) (Stanislawek *et al.*, 2002).

A pesar de que la mayoría de virus aislados de patos han sido lentogénicos. Existe preocupación con estas cepas, debido a los posibles cambios genéticos que pueden ocurrir en

virus de baja virulencia durante la replicación y su recirculación en pollos, ya que es mucho más fácil de transmitir estos virus a partir de patos domésticos que de aves silvestres (Liu, 2007).

En Irlanda (1990) el primer virus virulento fue aislado de dos brotes de ENC ocurridos aves de corral, dichos virus estaban antigénicamente y genéticamente estrechamente relacionados con virus avirulentos aislados de aves acuáticas salvajes en esa región (Alexander *et al.*, 1992). Más tarde en Australia fueron aislados virus patógenos durante el brote de ENC (1998-2000), que podrían sugerir que los virus lentogénicos podrían tal vez convertirse a virulentos con el tiempo y que un cambio en el sitio de escisión de la proteína de fusión del virus nativo daría lugar a aumento de la virulencia (Liu *et al.*, 2009).

En una investigación epidemiológica molecular del vENC en Corea, catorce virus fueron aislados de patos domésticos biológicamente sanos, el análisis filogenético reveló que pueden existir tres genotipos distintos (clase I genotipos 2 y 3b, y clase II genotipo Ib) en una especie (patos domésticos) y dentro de una ubicación geográfica, y durante un mismo año (Liu *et al.*, 2009).

En China, dos cepas velogénicas del virus de la ENC obtenidas a partir de brotes en los patos domésticos fueron caracterizadas, el análisis filogenético reveló que ambas cepas debían estar agrupadas con virus de clase II, y el secuenciamiento de aminoácidos de la proteína F confirmó que ambos aislados eran altamente virulentos en todos los pollos susceptibles y uno de los aislados demostró también patogenicidad leve en patos domésticos, además sugiere que más de un genotipo de vENC circula en los patos domésticos en China y que la transmisión del virus puede ocurrir entre los pollos y patos domésticos (Zhang *et al.*, 2011a).

Un estudio realizado en Brasil, se logró aislar el vENC a partir de heces de patos colectadas en el municipio de Japeri, la cual. Fue identificada por HI y caracterizada mediante pruebas de patogenicidad in vivo, las cuales determinaron que el aislado como mesogénico,

siendo un riesgo para la avicultura comercial. La investigación se originó a partir de la notificación en aves de traspato (gallinas, patos y gansos) que presentaban signos clínicos sugestivos con la ENC, más de cien aves, morían principalmente patos domésticos (Oliveira, 2005).

Resultados del sistema de vigilancia del virus de la ENC en patos domésticos en los mercados de aves vivas en China Oriental entre el 2002 y 2007, muestran claramente que vENC están regularmente presentes en la población de patos domésticos (Liu *et al.*, 2009). Este estudio también reconfirma una ecología compleja para los vENCs en patos domésticos: la circulación de más de un genotipo. Estos resultados también concuerdan con el trabajo publicado recientemente por Kim *et al.*, (2007a), quienes encontraron cepas de baja virulencia recuperados de aves acuáticas y costeras en los EEUU, los cuales presentaron amplia diversidad filogenética, y estaban genéticamente relacionados con virus de mercados de aves vivas, lo que sugiere que la transmisión entre las aves acuáticas, las aves playeras y aves en los mercados de aves vivas pueden ocurrir (Liu *et al.*, 2009).

El papel de los patos en la transmisión del vENC para pollos de aldea se investigó experimentalmente, demostrando que si bien los patos pueden ser infectados con virus velogénico y no muestran signos clínicos, son capaces de transmitir el vENC a los pollos en contacto. Se necesita adicional información para dilucidar cuánto tiempo más los patos siguen siendo infecciosos (Onapa *et al.*, 2006).

2.6.2 Distribución

El amplio uso de vacunas para el control de la ENC en la avicultura comercial hace imposible la determinación real de la distribución geográfica de la enfermedad (Alexander, 2003). La infección ha sido demostrada en todos los continentes incluyendo la Antártica (King *et al.*, 2002). Sin embargo, las figuras producidas podrían no ser representativas de la verdadera

distribución del vENC, en algunos países o áreas la enfermedad no se reporta del todo o solo se reporta cuando sucede en aves comerciales ignorando la presencia del vENC en aves de traspatio o crianza de aldeas (Alexander *et al.*, 2004).

No existe duda que el vENC es o enzoótico o una causa regular de epizootias en la mayor parte de África, Asia, Centro América y áreas de Sudamérica. En el Continente Americano durante el último lustro se han reportado brotes de la enfermedad en la industria avícola comercial en México, Honduras, Colombia, Venezuela, en varios estados de los Estados Unidos y en Canadá (Senne, 2003; Pedersen *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2005). En zonas más desarrolladas como Europa Oriental, ocurren epizootias esporádicas de forma bastante común aun cuando se utilizan rutinariamente vacunas (Alexander, 2003).

La distribución del vENC es dependiente de los intentos de erradicación y control realizados en los distintos países. El éxito de tales medidas es dependiente de la naturaleza de la industria avícola (países con significativa población avícola de traspatio, tienen problemas más serios que aquellos que cuentan con mayor población comercial) (Alexander *et al.*, 2004), además este tipo de crianza ha sido responsabilizados de mantener la enfermedad endémica en países donde su crianza es masiva, así como de ocasionar brotes en las explotaciones avícolas industriales (Ferrer, 2005).

En Europa occidental hubo un incremento de brotes durante el inicio de los 90s, llegando al pico con 239 brotes en el año 1994 (Alexander *et al.*, 2004) que afectó a pollos de engorde y ponedoras comerciales, en algunos casos con alta mortalidad debido a cepas velogénicas viscerotrópicas (Villegas y Avellaneda, 1995). La distribución sugería que se trataba de una sola epidemia desde los inicios hasta mediados de la década de los 90s; pero evidencia antigénica y filogenética indican que diversas cepas virales fueron las responsables de dichos brotes. Hasta 1995 la mayoría de los brotes ocurridos en la UE ocurrieron en los países Benelux (Bélgica, Países bajos y Luxemburgo) y Alemania, predominantemente en aves de

traspatio. La mayoría de los brotes a partir de 1995 han sido en este tipo de aves (Alexander *et al.*, 2004).

Un aspecto notable de los brotes durante la década de los 90s fue que se presentaron en países que habían estado libres de la ENC por muchos años. Desde 1932, Australia había estado libre de vENC virulentos. A partir de 1966, se reconocieron virus similares al patotipo entérico asintomático en aves silvestres, y ocasionalmente se habían diseminado a parvadas comerciales. Entre 1995 y 1999, se presentaron 18 brotes en Dinamarca, dos en Finlandia, 27 en Irlanda del Norte, y uno en Suecia, Noruega e Irlanda, áreas libres de ENC que eran monitoreadas regularmente sin obtener evidencia de infecciones por el vENC a excepción de incursiones ocasionales de virus avirulentos típicamente diseminados a partir de aves silvestres (Alexander *et al.*, 2004).

Dos brotes de vENC virulentos ocurrieron en Australia en 1998 (Alexander *et al.*, 2004). Durante los años 1999 y 2000, han ocurrido brotes de la ENC en todo el mundo, dichos brotes han comprometido a más de 100,000 aves en Brasil, Honduras, Italia y México. Otros reportes acerca de brotes de la ENC, incluyen los ocurridos en Canadá (1997), México (2000-2001), América central (2000) y los EEUU (1998, 2002-03) (Vargas, 2003).

Una de las más extensas epidemias en Europa occidental ocurrió en Italia en el 2000 en donde se confirmaron 254 brotes, mayormente en aves de traspatio (Alexander *et al.*, 2004). A finales del 2002, en el sur de California ocurrió un brote en aves comerciales, éste se diseminó a granjas vecinas aislándose el virus velogénico viscerotrópico, como consecuencia de ello muchas zonas en el sur de California fueron despobladas debido a la enfermedad (Vargas, 2003). Debido a este brote se analizaron muestras de especies aviares no comerciales, 57 especímenes de 25 especies diferentes fueron positivas para el vENC, todas estas aves se encontraban o dentro de granjas infectadas o dentro de un radio de 1 Km. de ésta (Kinde *et al.*, 2005).

A nivel mundial, la enfermedad está presente en países asiáticos y africanos principalmente; y en algunos países de Norteamérica y Sudamérica (Ecuador, Bolivia, Colombia, Venezuela y Perú) (OIE, 2013).

En el 2007, el Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG), notificó oficialmente a la OIE un brote de la ENC, causado por una cepa de PMAV-1 que afectó solamente a aves marinas, las cuales principalmente mostraron signos nerviosos. La mortalidad fue observada en diferentes especies de aves marinas como: guanay (*Phalacrocorax bougainvillii*), pingüino magallánico (*Spheniscus magellanicus*), piquero (*Sula variegata*) y pelícano (*Pelecanus thagus*) (Jeria et al., 2009).

En el año 2006, se reportó ante la OIE, un brote de la ENC, causado por una cepa altamente patógena que causó mortalidad en patos de crianza de traspatio que implicó un único caso en aves de corral (patos) de traspatio El 5 de julio del 2005, Brasil notificó un brote de esta enfermedad en aves de traspatio, en el estado de Río Grande do Sul, implicando 17 casos y la destrucción de 27 aves. (OIE, 2006).

2.6.3 Trasmisión

La ENC es altamente contagiosa (Carter *et al.*, 2005), siendo la vía horizontal la principal vía de transmisión, la cual se puede dar por inhalación de aerosoles y partículas de polvo, o a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados, debido a que las secreciones respiratorias y las heces contienen altas concentraciones de virus.

La excreción de virus ocurre muchas veces antes que empiece la manifestación de signos clínicos de la enfermedad (durante el periodo de incubación), se puede dar incluso cuando las aves se han recuperado de la infección clínica; por otro lado, se menciona que algunas aves vacunadas y con desafío viral no muestran todos los signos clínicos; sin embargo,

pueden excretar el virus, al igual que patos y gansos infectados con cepas altamente patógenas (Ferrer, 2005).

La literatura menciona diferentes tiempos de eliminación viral, para gallináceas la eliminación del PMAV-1 es por solo 1-2 semanas, pero a menudo las psitácidas lo eliminan durante varios meses; algunas especies de aves psitácidas pueden eliminarlo por más de un año. La eliminación prolongada se ha observado también en algunos miembros de otros órdenes, incluidos los búhos (más de cuatro meses) y cormoranes (un mes) (Rovid *et al.*, 2008). Las aves de la familia de las palomas pueden transmitir el virus de modo intermitente durante un año o más (OIE, 2004). Además se ha comprobado que algunas especies del orden *Psittaciformes* y *Passeriformes*, son capaces de eliminar cepas virulentas del vENC durante largos períodos de tiempo (hasta de un año) sin mostrar signos clínicos. Los patos y los gansos son considerados reservorios naturales del vENC, y por tanto estarían eliminando virus de manera indefinida (Shengqing *et al.*, 2002; Stanislawek *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2009).

Durante el curso de la infección grandes cantidades de virus son excretadas en las heces, por lo cual la ingestión de heces es probablemente la mayor causa de diseminación de cepas entéricas avirulentas entre aves y de la variante de paloma, donde ninguna de las dos produce normalmente signos respiratorios en las aves infectadas (Jordan, 1990; Alexander, 2003).

La importancia de los aerosoles para mantener virus infecciosos por un periodo prolongado para su difusión depende de factores ambientales como la temperatura, humedad y la concentración de aves de corral infectadas (Carter *et al.*, 2005). Esta vía de diseminación fue considerada de gran importancia en los años 1970-1971, donde se logró detectar virus a una distancia de 64 metros de las granjas infectadas en la dirección del viento. Sin embargo, en los últimos años esta vía no ha sido responsable de ninguno de los brotes (Rovid *et al.*, 2010).

La transmisión vertical es controversial. En evaluaciones experimentales con virus virulentos por lo general conllevan al cese de la postura; en cambio, en infecciones naturales en reproductoras generalmente se produce la muerte del embrión durante la incubación; sin embargo, con virus lentogénicos o vacunales se pueden lograr pollitos. Huevos infectados rajados o rotos, podrían servir como fuente de infección para pollitos BB. En cáscaras contaminadas con heces, el virus podría penetrar la cáscara después de la postura, complicando aún más la determinación de una verdadera transmisión vertical o transovárica. En infecciones naturales, no está claro cómo los embriones se llegan a infectar, aunque se ha demostrado que la cepa vacuna La Sota está presente en la mayoría de los órganos reproductores después de la vacunación (Alexander, 2003).

El PMAV-1 es transmitido fácilmente mediante fómites. La propagación mecánica entre lotes se ve facilitada por la relativa estabilidad del virus. La supervivencia se prolonga en las cáscaras de huevo y especialmente en las heces, si se la compara con la supervivencia en una superficie inorgánica (papel filtro). La información publicada sobre la supervivencia del virus es muy variable, probablemente debido a que se ve afectada por varios factores: humedad, temperatura, agentes en suspensión y exposición a la luz (Alexander *et al.*, 2004).

Un estudio concluyó que el PMAV-1 sobrevivió en gallineros contaminados y sin limpiar hasta, 7 días en verano, 14 días en primavera y 30 días durante el invierno. Sin embargo, un estudio encontró que el PMAV-1 permaneció viable hasta 255 días en un gallinero, a una temperatura ambiente de -11°C a 36°C. Entre 23-29°C, se ha informado que el PMAV-1 sobrevive en la basura contaminada de 10 a 14 días y a 20°C, en el suelo durante 22 días. El virus también se ha recuperado de las lombrices entre 4 a 18 días y de lagos experimentalmente contaminados entre 11 a 19 días. Las moscas pueden ser capaces de transmitir mecánicamente el virus, pero aún es incierto si los insectos pueden portar suficiente virus para infectar a las aves de corral (Rovid *et al.*, 2008).

Muchos factores participan en la diseminación del virus, el sobrecalentamiento de aves podría ser un factor desencadenante (Gerlach, 1994). Se ha demostrado mayor sobrevivencia del vENC en la temporada seca que en las lluvias (Onapa *et al.*, 2006) aunque no se ha demostrado ningún pico estacional verdadero. La densidad poblacional es un factor importante (Jordan, 1990), ya que al haber mayor número de aves por espacio determinado, la transmisión vía nasal, por medio de secreciones nasales se ve facilitada debido el mayor contacto entre las aves.

El movimiento de aves vivas (silvestres, mascotas, aves de riña, palomas mensajeras y aves comerciales, etc.), personas, equipos, productos agrícolas, alimento o agua contaminada, insectos y roedores han sido implicados como fuente de diseminación en varias epizootias (Gerlach, 1994; King, 1999; Alexander, 2003). Pero sin lugar a duda, el mayor riesgo para la diseminación del vENC es la transferencia mecánica a través de material infectivo por el hombre, principalmente con heces (Alexander, 2003), en donde el virus puede estar presente en grandes cantidades, ya que es un excelente medio para la sobrevivencia del virus, donde la infectividad se ha mantenido por más de un mes incluso a 37°C (Jordan, 1990; OIE, 2002).

Prueba de esto fue lo ocurrido durante los brotes de la ENC en los EEUU durante el 2002 y 2003, el brote más notable ocurrió en el sur de California (Kinde *et al.*, 2005), donde la presencia generalizada de la enfermedad en gallos de pelea y la movilización de tales aves fueron considerados un gran problema para el control de la enfermedad, ya que dio lugar a la propagación del virus a 21 granjas comerciales y el sacrificio de 3 millones de aves. Los factores de mayor riesgo para las bandadas comerciales infectadas fueron los empleados de las granjas y la proximidad con las aves infectadas (Capua y Alexander 2009).

A pesar del comercio internacional de aves exóticas y su frecuente aislamiento de vENC virulento, la amenaza de introducción y diseminación por esta fuente ha sido ampliamente reducida con estrictos procedimientos de cuarentena en la importación. Aves de

contrabando o aquellas retiradas prematuramente de la cuarentena; sin embargo, continua siendo una gran amenaza (Alexander, 2003; Alexander *et al.*, 2004).

2.7 Presentación clínica

2.7.1 Periodo de Incubación

El periodo de incubación de la ENC después de la exposición natural ha sido reportado de entre 2 a 15 días (como promedio de 5 a 6 días). La velocidad con la que los signos aparecen, si es que aparecen, es variable dependiendo de la infectividad del virus, la especie huésped, la exposición previa al virus, la edad, el estado inmunológico, las infecciones concomitantes, las condiciones ambientales, la vía de exposición y la dosis (Alexander, 2003).

2.7.2 Signos clínicos

Las manifestaciones clínicas siguen siendo las mismas desde su descripción inicial en los años 1926 de las formas más patógenas, posteriormente en los años 40s y 50s de formas menos patógenas y en la década de los 60s se identificó a infecciones asintomáticas (King, 1999). La respuesta de las aves a la enfermedad es lo que varía ampliamente y está determinada por la interacción entre la susceptibilidad del hospedero y la virulencia de la cepa del virus infectante.

Otros factores determinantes en la signología de la enfermedad son la edad del huésped, estatus inmune, estrés ambiental, infecciones mixtas con otros microorganismos, la vía y dosis de infección (King, 1999; Alexander, 2003; Carter *et al.*, 2005). Los miembros del orden *Phasianiformes*, en particular los pollos, son altamente susceptibles a la enfermedad. Los pavos son menos propensos a desarrollar síntomas severos y la susceptibilidad de las aves de caza (faisanes, perdices, codornices y gallina de guinea) varía con la especie. Los patos y gansos

presentan generalmente infecciones inaparentes, pero algunas cepas (genotipos VI y VII) han causado brotes en gansos en China desde los 90s, describiéndose casos clínicos en patos (Rovid *et al.*, 2010). La entrada del virus por las rutas oral, nasal u ocular, incrementan los signos respiratorios, mientras que la penetración del virus por las rutas intravenosa, intramuscular e intracerebral acentúan las manifestaciones nerviosas (Alexander, 1997).

El virus es capaz de infectar a otros animales que van desde reptiles hasta el hombre, causándoles síntomas oculares como lacrimación, edema de párpados, conjuntivitis, o una hemorragia conjuntival (Capua y Alexander, 2004).

En base a los signos clínicos existe una clasificación de cinco patotipos (velogénico, mesogénico, lentogénico y entérica asintomática) de las diferentes cepas virales; sin embargo, ésta es útil con fines descriptivo, concuerda con lo encontrado en infecciones experimentales con aves SPF. A nivel de campo es difícil de distinguir a que patotipo corresponden, además de existir condiciones concurrentes e inmunosupresión que actúan como agravantes y cepas más suaves suelen observarse más virulentas. La patogenicidad es especie específica y varía considerablemente en infecciones experimentales en otras especies, incluso en dos especies del mismo género (Docherty y Friend, 2001).

Las manifestaciones clínicas de Newcastle velogénico viscerotrópico en pollos no siempre pueden ser predichas basándose en signos clínicos y lesiones, ya que éstos pueden verse alterados en su desarrollo por la inmunidad parcial. Los signos clínicos frecuentemente se inician con inapetencia, depresión, diarreas, incremento en la frecuencia respiratoria y debilidad; seguidos de un severo malestar respiratorio (boqueo y tos); finalizando con postración y muerte (OIE, 2002; Carter *et al.*, 2005). Así mismo, puede ocasionar edema alrededor de los ojos, cabeza y barbillas (Alexander, 1998). La mortalidad frecuentemente alcanza el 100% en parvadas de pollos completamente susceptibles (Alexander, 2003). Es común también encontrar opacidad en la córnea (Antillon, 2005).

La forma velogénica neurotrópica, se caracteriza por el inicio repentino de enfermedad respiratoria, seguida uno o días después por signos neurológicos como parálisis de patas y cuello, andar en círculos, temblores y caminar hacia atrás (OIE, 2002; Carter *et al.*, 2005). En aves adultas se observa inicialmente huevos sin cáscara con cáscara blanda, seguido del cese completo de postura. Es común encontrar anormalidades a nivel de la cáscara, deformes, delgadas, rugosas o con albumina acuosa (OIE, 2002). La morbilidad suele ser alta alcanzando un 100%, mientras que la mortalidad ha sido reportada hasta en un 50% en aves adultas y 90% en jóvenes (Alexander, 2003).

Las cepas mesogénicas del vENC por lo general ocasionan enfermedad respiratoria, en infecciones de campo los signos incluyen depresión, tos y estornudos (Carter *et al.*, 2005). En aves adultas, se presenta una marcada caída en la producción de huevos la cual puede durar por varias semanas (Alexander, 2003). En aves jóvenes pueden ocurrir signos nerviosos poco después que aparezcan los signos respiratorios, éstos no son comunes e incluyen caída de las alas, posición anormal de la cabeza y el cuello y parálisis (Carter *et al.*, 2005). La mortalidad en la parvada por lo general es baja, con excepción de aves muy jóvenes y animales susceptibles (hasta el 50%) (Carter *et al.*, 2005; Alexander, 2003).

Los virus lentogénicos usualmente no ocasionan enfermedad en aves adultas. En aves jóvenes, totalmente susceptibles, la cepa más patogénica La Sota puede ocasionar problemas respiratorios serios con mortalidad después de la complicación con uno o más microorganismos o por malas prácticas de manejo, que favorece la exacerbación de problemas respiratorios comparables con los producidos por cepas más virulentas (Jordan, 1990). La vacunación o infección de pollos de carne cerca al beneficio, puede llevar a coliseptisemia o aerosaculitis (Alexander, 2003). Infecciones intestinales producidas por aislamientos de baja virulencia que no producen una enfermedad obvia, han sido denominadas como la forma entérica-asintomática (King, 1999).

En aves de riña la enfermedad es muy parecida a la de pollos; en avestruces y otras ratites, virus virulentos para pollos no producen una enfermedad tan patogénica, las aves jóvenes muestran depresión y signos nerviosos, los adultos no se ven afectados (Alexander, 2000). Los signos clínicos en otros huéspedes pueden diferir significativamente de los observados en pollos. Los pavos muestran signos clínicos menos severos y, aun cuando los patos y gansos son considerados clínicamente resistentes se han descrito casos clínicos de infecciones naturales.

Experimentalmente patos domésticos (*Anas platyrhynchos*) fueron infectados con siete cepas del virus de Newcastle, de diferente origen aviar. Dos cepas virulentas resultaron altamente patógenas para los patos, una cepa originaria de patos y la otra cepa estándar de China. Estas cepas causaron morbilidad y mortalidad altas, y se distribuyeron ampliamente en varios tejidos de los patos infectados (Dai, *et al.*, 2012). Por el contrario, la cepa virulenta de palomas, la cepa virulenta para pollos, la virulenta para gansos y las cepas vacunales Mukteswar y La Sota no mostraron patogenicidad para los patos, no indujeron signos clínicos de la enfermedad ni efectos adversos sobre el crecimiento de los patos infectados y persistieron en los órganos por un corto período (Dai *et al.*, 2012).

Respecto a la propagación del virus fue detectada en todos los patos infectados, pero su periodo y ruta variaba con la virulencia de las cepas de Newcastle. Los resultados sugieren que el virus de Newcastle de alta patogenicidad en patos pueden surgir de la evolución dentro de su hospedero correspondiente, además de confirmar que los patos juegan un papel importante en la epidemiología de la ENC (Dai *et al.*, 2012).

2.7.3 Patología

2.7.3.1 Lesiones Macroscópicas

Las lesiones macroscópicas y los órganos afectados en aves infectadas con el vENC son dependientes de la cepa y el patotipo del virus infectivo (Carter *et al.*, 2005), además, la especie afectada y otros factores pueden tener un efecto sobre la severidad de la enfermedad. Las lesiones por si solas no dan el diagnóstico de la enfermedad debido no existen lesiones patognomónicas asociadas a ninguna forma de la enfermedad, en algunos casos pueden estar ausentes (Alexander, 2003). Para poder establecer un diagnostico presuntivo basándose en el tipo de lesiones, se debe examinar un buen número de aves (OIE, 2002). Sin embargo, la presencia de lesiones hemorrágicas en el intestino de pollos infectados ha sido utilizada para distinguir VVND (Enfermedad de Newcastle Velogénico Viscerotrópico) de NVND (Enfermedad de Newcastle Velogénico Neurotrópico), una distinción de importancia para las medidas regulatorias en el diagnóstico de la ENC en los EEUU. Estas lesiones son por lo general particularmente prominentes en la mucosa del proventrículo, ciegos e intestino delgado (Carter *et al.*, 2005) y aparecen como resultado de la necrosis de la pared intestinal o el tejido linfoide como tonsilas cecales y placas de Peyer (Alexander, 2003). En cuanto las carcacas de aves, tienen una apariencia febril y de deshidratación (Alexander *et al.*, 2004).

La evaluación de lesiones macroscópicas del SNC (Sistema Nervioso Central) de aves infectadas con vENC generalmente, no son visibles, independientemente del patotipo presente (Alexander, 2003), así como cambios patológicos en el tracto respiratorio, pero cuando son visibles, consisten predominantemente en inflamación (Jordan, 1990), hemorragias en la mucosa y una marcada congestión de la tráquea. Se puede observar aerosaculitis incluso después de la infección con cepas relativamente suaves (Jordan, 1990; Alexander, 2003).

Pollas y pavas infectadas en la etapa de postura con virus velogénicos por lo general presentan yemas de huevo en la cavidad abdominal. Los folículos ováricos frecuentemente flácidos y degenerativos. Puede ocurrir hemorragia en los órganos del aparato reproductivo (Alexander, 2003).

2.7.3.2 Lesiones Microscópicas

La histopatología de las infecciones con el vENC es tan variada como los signos clínicos y las lesiones macroscópicas y se ve ampliamente afectada por los mismos parámetros: la cepa viral, el huésped, el método de infección que tiene mucha importancia. Se demostraron cambios histopatológicos similares en tráqueas de pollos infectados por cepas lentogénicas o velogénicas por inhalación de aerosol. Sin embargo, para fines diagnósticos, las lesiones microscópicas no tienen ninguna relevancia (Alexander *et al.*, 2004). La mayor parte de las lesiones histológicas descritas en publicaciones se refieren a los cambios relacionados a patotipos virulentos. Los mayores cambios que suceden son los siguientes:

2.7.3.2.1 Sistema nervioso

Las lesiones observadas en el sistema nervioso central son las de una encefalitis no purulenta con degeneración neuronal, focos de células gliales, infiltración perivascular de linfocitos e hipertrofia de células endoteliales. Las lesiones son frecuentemente observadas en el cerebelo, medula y zona central del cerebro (Alexander, 2003).

2.7.3.2.2 Sistema vascular

Son comúnmente encontrados congestión, edema y hemorragia asociados a vasos sanguíneos de muchos órganos. Otros cambios que pueden ser observados consisten en degeneración hidrópica de la capa media, hialinización de los capilares y arteriolas, desarrollo

de trombosis hialina en pequeños vasos y necrosis de células endoteliales de los vasos (Alexander, 2003).

2.3.3.2.3 Sistema linfoide

Cambios regresivos son hallados en el sistema linfopoyético, los cuales consisten en la desaparición del tejido linfoide. Se observa hiperplasia de las células fagocíticas mononucleares en varios órganos, especialmente en el hígado, sobretodo en infecciones sub-agudas. Se encuentran lesiones necróticas a través del bazo, vacuolación focal y destrucción de linfocitos en las áreas corticales y centros germinales del bazo y timo. En la región medular de la bursa de Fabricio se observa una marcada degeneración de los linfocitos (Alexander, 2003).

2.3.3.2.4 Tracto intestinal

En las infecciones de algunas formas virulentas del vENC se puede observar hemorragia y necrosis del tejido linfoide de las mucosas a través del tracto intestinal. Otras lesiones se encuentran relacionadas a cambios en el sistema vascular (Alexander, 2003).

2.3.3.2.5 Tracto respiratorio

El efecto del vENC sobre las membranas del tracto respiratorio superior puede ser severo y está relacionado con el grado de afección respiratoria. Las lesiones se pueden extender a través de toda la tráquea. Se pueden perder los cilios dentro de los dos días post-infección. En la mucosa del tracto respiratorio superior se puede observar congestión, edema y una densa infiltración celular por linfocitos y macrófagos, especialmente después de una exposición por aerosol. Algunas veces se observan lesiones proliferativas y exudativas en el pulmón. El proceso tiende a desaparecer rápidamente, y aves examinadas 6 días después de la infección, podrían estar libres de inflamación (Alexander, 2003).

2.3.3.2.6 Sistema reproductivo

Los cambios histopatológicos en el tracto reproductivo son extremadamente variables. Algunos han reportado que el mayor daño funcional se da en el útero o en la porción formadora de cáscara en el oviducto. Los cambios en los órganos reproductivos incluyen atresia folicular con infiltración de células inflamatorias y la formación de agregados linfoides. Agregados similares están presentes en el oviducto (Alexander, 2003).

2.8 Diagnóstico

El principal valor del diagnóstico reside en poder tomar las decisiones y medidas de control adecuadas y oportunas. Ninguno de los signos o lesiones del vENC pueden ser considerados patognomónicos, además la amplia variación de la enfermedad según a cepa viral, el huésped afectado y otros factores hacen que estos parámetros indiquen solo sospecha de infección con el vENC. Es necesario solicitar pruebas de laboratorio que permitan confirmar el diagnóstico presuntivo, dichas pruebas no solo deberán demostrar la infección viral, sino también la determinación del tipo viral, de ahí la importancia de las pruebas de diagnóstico definitivo (Alexander, 2003).

2.8.1 Aislamiento e identificación viral

El único método inequívoco de diagnóstico hasta el momento es el aislamiento viral y subsiguiente caracterización, los cuales deben de realizarse en laboratorios de bioseguridad especial (Alexander, 2003; OIE, 2008). En los EEUU los virus virulentos pueden ser propagados en laboratorios con nivel de bioseguridad 3 (BSL-3). Este método tiene el inconveniente de que los procedimientos utilizados generalmente son lentos pues requieren de múltiples pases, lo cual constituye una desventaja para el control de los brotes (Li y Zhang,

2004) debido a la rapidez con que se diseminan las enfermedades virales y el corto tiempo de vida productiva de la mayoría de las aves comerciales.

Por otra parte, la presencia de cepas lentogénicas de Newcastle en poblaciones avícolas y el amplio uso vacunas vivas hacen que el aislamiento no sea suficiente, siendo necesario realizar identificación y caracterización viral, utilizando pruebas de laboratorio que permitan determinar la patogenicidad del aislado, ya que la importancia e impacto están directamente relacionado con la virulencia (Alexander, 1997; Kommers *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo el aislamiento viral, en casos de enfermedad severa con alta mortalidad se utilizan muestras procedentes de aves muertas o recientemente eutanasiadas que incluyen exudado oro-nasal y muestras de órganos como; tráquea, pulmones, intestino (con material fecal), cerebro, bazo, hígado, riñones y corazón. En el caso de aves vivas se utilizan exudados traqueales y cloacales (con restos de heces) (OIE, 2008).

Las muestras se preparan y se inoculan en la cavidad alantoidea de al menos 4 huevos embrionados de 9 a 11 días de edad, se incuban a una temperatura de 35-37°C durante de 4 a 7 días y se examinan al trasluz diariamente. El líquido alantoideo de cada huevo al final del periodo de estudio deberá ser sometido a una prueba de hemaglutinación. La actividad HA detectada en líquidos bacteriológicamente estériles recogidos a partir de huevos inoculados puede deberse a la presencia de cualquiera de los 16 subtipos de hemaglutininas de los virus de Influenza Aviar o de los ocho restantes serotipos de paramixovirus. El líquido no estéril podría contener actividad HA bacteriana. Si resultase negativo, deberá repetirse el procedimiento anterior utilizando fluido alantoideo no diluido como inóculo (OIE, 2008).

Todos los virus hemaglutinantes deberán identificarse. La identificación se realizará mediante diferentes técnicas serológicas como HI, VN, la inmunodifusión doble o agar gel

difusión y el ELISA. Sin embargo, el método convencional más utilizado es la inhibición de la hemaglutinación (HI) (Alexander, 1998).

El PMAV-1 puede confirmarse empleando antisuero específico en una prueba de HI. Habitualmente se utiliza el antisuero de pollo preparado contra una de las cepas del vENC. Algunas pruebas de HI utilizan anticuerpos monoclonales que pueden identificar cepas del PMAV-1. Aunque se han reportado reacciones cruzadas entre el PMAV-1 y el PMAV-3 (Paramixovirus Aviar Tipo 3), particularmente cuando este último es aislado de psitácidas, de aves en cautiverio o exóticas, así como, con el PMAV-7 (Paramixovirus Aviar Tipo 7) aislado de avestruces, pavos y palomas (OIE, 2004). Las reacciones cruzadas en las pruebas de HI entre el vENC y algunos otros PMAVs (paramixovirus aviares), especialmente con los virus de los serotipos APMV-3 y APMV-7, pueden causar algunos problemas que pueden resolverse empleando controles adecuados de antígeno y antisuero (OIE, 2009).

Por lo tanto, para confirmar la presencia del virus puede emplearse un antisuero específico preparado contra una de las cepas del vENC en una prueba de HI (Inhibición de la Hemaglutinación). Esto comprueba la infección del ave por el virus, pero no indica si se trata de un virus patogénico o una cepa avirulenta (Alexander *et al.*, 2004). La aplicación de esta técnica en la identificación de los aislamientos, se ve favorecida por el hecho de que los aislados de este virus pertenecen a un solo serotipo por su facilidad y bajo costo (Alexander, 1997; Alexander, 1998; OIE, 2008).

La variación extrema en la virulencia de los diferentes aislamientos víricos de la ENC y el uso generalizado de vacunas vivas, implica que la identificación de un aislamiento como vENC a partir de aves que muestren signos clínicos no confirma un diagnóstico de ENC. Por lo tanto, el diagnóstico definitivo se logra sobre la base del aislamiento y la identificación viral (Alexander, 1997) y con el empleo de las técnicas moleculares que permitan la detección

específica del virus, así como, la determinación de su potencial de virulencia (Barbezange y Jestin, 2002; Creelan *et al.*, 2002; Li y Zhang, 2004).

La caracterización patogénica de los aislados del vENC se realiza, de acuerdo con lo reportado en la OIE (2008), por el ICPI en pollitos SPF de 1 día de edad y por la determinación de la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión del péptido conectante de la proteína F. Es importante destacar que la falta de detección de virus o la detección de vENC sin múltiples aminoácidos básicos en el punto de escisión de F0 empleando técnicas moleculares no confirma la ausencia de virus virulentos (Sánchez y Vizcaíno, 2009).

2.8.2 Técnicas moleculares

La introducción de las técnicas moleculares como prueba aceptada para el diagnóstico, identificación y caracterización del vENC por la OIE (2008) ha posibilitado realizar el diagnóstico de una forma rápida, segura, sensible y específica que permita tomar las medidas de control adecuadas para prevenir la posterior diseminación y minimizar las pérdidas ocasionadas por la enfermedad (Cuello *et al.*, 2011).

Diferentes ensayos moleculares para la detección y/o diferenciación de las cepas y aislados del vENC han sido desarrollados sobre la base de las diferencias en las secuencias nucleotídicas en la región del péptido conectante de la proteína F que correlacionan con los diferentes fenotipos virales (Aldous y Alexander, 2001).

El PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) puede ser usado para ratificar un resultado previo obtenido de otra prueba, así como una sospecha en el caso de animales que presenten signos clínicos y un grado importante de mortalidad. Sin embargo, no basta con demostrar que se ha aislado un virus de Newcastle y que ha sido confirmado por PCR sino que

también hay que demostrar si el virus aislado es de alta o baja patogenicidad (Rodríguez *et al.*, 2009).

Idealmente las técnicas moleculares podrían permitir la amplificación de los genomas virales directamente de tejidos infectados para evitar la necesidad de aislar el virus. Sin embargo, esto se ve impedido por la presencia de inhibidores de PCR en muchos órganos y tejidos, especialmente sangre y heces (Nanthakumar *et al.*, 2000; Creelan *et al.*, 2002). Con frecuencia se utilizan frotis traqueales u orofaríngeos como muestras de elección porque son fáciles de procesar y por lo general, contienen poco material orgánico extraño que pueda interferir con la recuperación y amplificación del ARN mediante la PCR. No obstante, también se han utilizado con cierto éxito muestras de tejidos y de órganos e incluso las heces.

La mayoría de las técnicas moleculares que involucran el PCR y debido a que el vENC posee un genoma ARN, es esencial un paso inicial con transcriptasa reversa (RT) para producir copias del genoma de ADN (Alexander, 2003; Miller *et al.*, 2005). El sistema utilizado para la extracción del ARN influirá en la eficacia de la RT-PCR con muestras clínicas, e incluso en el caso de los kits comerciales se debe procurar escoger los más adecuados o validados para las muestras a examinar (Cuello *et al.*, 2011).

Normalmente se han utilizado sistemas de RT-PCR (transcritasa inversa/reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar una porción específica del genoma que tienen un valor añadido; por ejemplo, amplificando parte del gen F que contiene el punto de escisión F0 de manera que el producto pueda utilizarse para valorar la virulencia (Creelan *et al.*, 2002).

El principal inconveniente de la utilización de la RT-PCR para el diagnóstico tal vez reside en la necesidad del procesamiento que sigue a la amplificación debido a la alta probabilidad de contaminación del laboratorio y de contaminación cruzada de las muestras (OIE, 2012). Además del uso de la RT-PCR y de otras técnicas similares para la determinación

de la virulencia del vENC o para estudios filogenéticos, cada vez se utilizan más tales técnicas moleculares para detectar el vENC en muestras clínicas, con la ventaja de la demostración extremadamente rápida de la presencia del virus (OIE, 2012).

Una de las estrategias que se siguen para no tener que realizar el procesamiento post-amplificación consiste en la utilización de las técnicas de RT-PCR (rRT-PCR) en tiempo real. La ventaja de esta prueba es que la rRT-PCR es que hace innecesaria la fase de procesamiento post-amplificación y se pueden obtener los resultados en menos de 3 horas. Esta prueba rRT-PCR fue utilizada para la detección de PMAV-1, cuando se produjeron los brotes de ENC durante el 2001-2003 en EEUU (OIE, 2012).

El PCR tiempo real puede diferenciar entre cepas de alta y media patogenicidad. Sin embargo, este tipo de pruebas podrían no detectar todas las cepas debido a mutaciones en los genes (Wise *et al.*, 2004a). Los iniciadores usados deben de ser seleccionados de regiones bastante conservadas con muy pocos polimorfismos. Estas pruebas no sólo son rápidas, sino que también han demostrado tener una sensibilidad al menos igual a la del aislamiento viral convencional (Omar *et al.*, 2005).

En el diagnóstico de la ENC es importante comprender que la demostración de la presencia de virus con múltiples aminoácidos básicos en el lugar de división de la proteína F0 confirma la presencia de virus virulentos o potencialmente virulentos, pero la falla en la detección de virus o la detección de vENC sin la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el lugar de división F0 utilizando técnicas moleculares no confirma la ausencia de virus virulentos. La utilización de un primer no adecuado, o la posibilidad de una población mixta de virus virulentos y avirulentos significa que el aislamiento viral y la determinación de la virulencia *in vivo* seguirán siendo requeridas (OIE, 2004).

Se debe prestar atención cuando se aísla de campo una cepa no virulenta del vENC que presenta solo uno o dos aminoácidos diferentes en el lugar de división de la proteína F comparados con cepas virulentas ya que estas pueden evolucionar a cepas virulentas (De Leeuw *et al.*, 2003).

2.8.3 Pruebas Serológicas

Anticuerpos para el vENC pueden ser detectados en sueros aviares por medio de una variedad de pruebas incluyendo inmunodifusión radial, hemólisis radial, precipitación en agar gel, VN en embriones de pollo y neutralización en placa. En la actualidad, el HI es la prueba más ampliamente utilizada en la serología de la ENC; su relevancia en el diagnóstico depende del estado inmunitario vacunal de las aves a analizar y de las condiciones predominantes de la enfermedad (OIE, 2012).

La presencia de anticuerpos específico al vENC en las aves ofrece poca información sobre la cepa del virus infectante y por lo tanto tiene limitado valor diagnóstico. Sin embargo, poblaciones aviares no vacunadas, la demostración de anticuerpos indica que ha sucedido la infección lo que unido a un cuadro clínico observado es suficiente para emitir un diagnóstico (OIE, 2004). De otro lado, es frecuente el empleo de kits comerciales de ELISA para evaluar los niveles de anticuerpos post-vacunación.

Se ha reportado una buena correlación entre las pruebas de ELISA y las de HI (Alexander, 2003). Estas pruebas detectan diferentes tipos de anticuerpos; mientras que en ELISA son principalmente Igs G, en la prueba HI son Igs M, teniendo la prueba HI una muy buena sensibilidad para respuestas inmunes inducidas por cepas de campo y la prueba de ELISA para respuestas inducidas por cepas vacunales. Los resultados de las pruebas serológicas por lo general requieren de dos días, a diferencia de los cultivos virales que pueden tomar de 3 a 5 días hasta varias semanas (Gerlach, 1994). En general, los títulos obtenidos mediante neutralización

vírica o HI y los derivados del ELISA se correlacionan a nivel de parvada más que a nivel de ave (OIE, 2012).

El fluido alantoideo infectivo apropiadamente diluido puede ser utilizado como antígeno en pruebas de HI. El uso de antígenos no infecciosos por lo general es deseable, y para el vENC por lo general se utiliza como antígeno virus inactivado con formalina (fluido alantoideo infectivo tratado con formalina al 0.1%). Se puede utilizar β -propiolactona como alternativa en algunas instancias (Alexander, 1998). Los sueros de pollos raramente dan respuestas positivas no específicas en esta prueba y cualquier tratamiento previo del suero será innecesario (OIE, 2004).

Existe evidencia que las menores variaciones antigénicas entre diferentes cepas puede ser eliminada por adsorción con concentrado de glóbulos rojos de pollos antes de la prueba (Alexander, 2003; OIE, 2004). Alternativamente, el uso de células rojas de la especie homóloga se puede tomar en consideración (Alexander, 1998).

Las pruebas de HA e HI no se ven muy afectadas por cambios menores en la metodología, aunque se ha recalcado la naturaleza crítica del período de incubación del complejo antígeno/anticuerpo en pruebas de estandarización. Estudios no siempre han reportado buena reproductividad en pruebas de HI entre distintos laboratorios (Alexander, 2003).

Existe una variedad de kits comerciales de ELISA, usualmente estas pruebas han sido evaluadas y validadas por el productor, y es por esto es muy importante que se sigan cuidadosamente las instrucciones especificadas para su uso (OIE, 2004). La mayor ventaja de las pruebas ELISA es que suelen ser semiautomáticas, lo que permite la obtención de resultados rápidamente y de forma económica, especialmente cuando el suero debe ser analizado contra anticuerpos para varios virus. El valor de ELISA para el diagnóstico se ve afectado por la necesidad de modificar y validar la prueba para diferentes especies. Los ELISAs por lo general

son muy sensibles y esto podría restringir su valor en pruebas diagnósticas cuando existen relaciones antigénicas, como es el caso de los paramixovirus aviaries. Ambos problemas se pueden solucionar con el uso de ELISA competitivo empleando uno o más MABs, aunque se necesitaría buena evidencia que los MABs reaccionarán con todas las cepas del vENC y no con los otros paramixovirus aviaries (Alexander, 1998).

2.8.4 Pruebas de Patogenicidad

La importancia y el impacto de un aislamiento del vENC están directamente relacionados con la virulencia de dicho aislamiento. Debido a que la enfermedad de campo podría ser una medida poco confiable de la verdadera virulencia del virus, es necesario realizar la evaluación de la patogenicidad por medios de laboratorio. En la actualidad se utilizan 4 pruebas *in vivo* para este propósito (Alexander, 1998; King, 1999; Alexander, 2003; OIE, 2004): El Tiempo letal medio en huevos (MDT - Mean Death Time), el Índice de Patogenicidad Intracerebral (ICPI – Intracerebral Pathogenicity Index), el Índice de Patogenicidad Endovenosa (IVPI – Intravenous Pathogenicity Index) y la Prueba de Patogenicidad por Inoculación Intracloacal

De todas las pruebas de patotipificación, la prueba *in vivo* recomendada es el método de ICPI, considerado como el mejor para predecir la virulencia o potencial virulencia de las cepas del vENC debido a que permite la diferenciación de virus lentogénicos de los virus mesogénicos y velogénicos, por esta razón el ICPI tiene un rol más importante en la diferenciación de cepas de baja y alta virulencia en la actual definición de ENC por la OIE (King, 1999). Además existen virus capaces de producir una severa enfermedad y presentar valores del IVPI de 0 (OIE, 2004).

2.9 Control y Bioseguridad

Uno de los objetivos del control es proteger a las aves de la infección con el vENC y por otra parte reducir el número de aves susceptibles mediante la aplicación de vacunas (Alexander, 1997). El factor primordial para tomar en cuenta en el control es la diseminación de la enfermedad y en consecuencia, por ello se adoptan disposiciones a nivel nacional e internacional que regulan el comercio de los productos avícolas, así como, de aves vivas. Sin embargo, los factores más importantes en prevenir la introducción de la enfermedad y su diseminación en presencia de un brote, son las condiciones bajo las cuales las aves son criadas y el grado de bioseguridad practicado en las explotaciones avícolas (Alexander, 1997). Así como la implementación de medidas que identifiquen y eliminen reservorios además de controlar las posibles fuentes de difusión (Alva, 2001).

La bioseguridad y la higiene constituyen dos elementos fundamentales para el control de la ENC (Alexander, 1997; FAO, 2004; King, 2004), las cuales deben ser rigurosamente aplicadas debido a la rápida diseminación que tiene esta enfermedad entre las poblaciones avícolas. La bioseguridad es la mejor defensa contra las enfermedades. De no cumplirse con las mismas de nada valdrían las técnicas de diagnóstico de avanzada y la producción de vacunas. La sola prevención permite lograr que el ave manifieste su potencial biológico productivo, por lo tanto el desarrollo y cumplimiento de un programa de bioseguridad constituye uno de los factores más importantes para reducir pérdidas debido al vENC (FAO, 2004).

El control de la enfermedad se logra vinculando de una manera correcta un buen programa de bioseguridad y un efectivo programa de vacunación, que incluya tanto a los progenitores como a la progenie. En países donde existe una importante crianza de animales de traspatio y la enfermedad se encuentra de forma endémica es poco probable que la vacunación por si sola pueda resolver el problema, y es importante que paralelamente se realicen programas

de educación sobre la enfermedad y su diseminación y sobre la adecuada crianza de animales (Brown y Alexander, 2003).

Las fuentes y vías de transmisión son los factores que esencialmente facilitan que los agentes se transmitan de una unidad a otra. En esto influyen las aves infectadas, los fómites, el agua y alimento contaminado, la yacija y otros desechos de la crianza. Además, el hombre es un factor muy importante en la transmisión de esta enfermedad ya que las visitas a las granjas por personal especializado son inevitables, lo que implica un reforzamiento en las medidas de higiene y desinfección (FAO, 2004).

A nivel nacional, en noviembre del 2002 se firmó el Convenio APA-SENASA con el principal objetivo de declarar al Perú como país libre de las enfermedades aviares de mayor impacto económico y que generan obstáculos al comercio, dentro de las cuales se encuentra la ENC. Los resultados obtenidos del trabajo compartido entre el sector privado y público, la importancia de la avicultura para la economía del país y el convenio antes citado constituyen la base para la creación del Programa Nacional de Sanidad Avícola (SENASA, 2004).

2.10 Enfermedad de Newcastle y la crianza de traspatio

La "avicultura familiar" es decir, la cría doméstica tradicional de gallinas, pavos, patos y gansos, gallinitas de Guinea, pichones, faisanes y codornices, que utiliza pocos insumos; es básica para la seguridad alimentaria en gran parte del mundo. Muchos países dependen de las aves de traspatio o crianza en aldeas para aportar una importante ración de proteína de origen animal, ya sea en la forma de huevos o carne, sobre todo a mujeres y niños. Las pérdidas constantes a causa de la ENC afectan severamente la cantidad y calidad de los alimentos de personas con dietas marginales (Alexander, 2003). Según cálculos recientes, la avicultura en el patio de casa y al aire libre representa hasta un 70% del total de la producción de huevos y carne de aves en los países de bajos ingresos y con déficit de alimentos (FAO, 2013). Se estima que

en países de Asia y África se tienen pérdidas del 60% de las aves de traspatio, por ejemplo, en 1992 se estimó que cada año el 90% de las aves de traspatio mueren en Nepal como resultado de la ENC (Brown y Alexander, 2003) y se comprobó en Chad que la enfermedad es endémica, ocasionando tasas de mortalidad de entre 65 a 100%, contribuyendo así a empeorar la pobreza y desnutrición (Maho *et al*, 2000). El mayor impedimento para la producción de pollos en la mayoría de los países en desarrollo es la ENC (Young *et al*, 2000).

Bajo condiciones de traspatio, las aves muestran niveles productivos y reproductivos relativamente bajos debido a deficiencias en el manejo de la alimentación y en el control de las enfermedades (FAO, 2013). Este tipo de producción está seriamente amenazada por la ocurrencia de enfermedades infecciosas, como la ENC en su forma virulenta (Alexander, 2001), que ocasiona graves pérdidas económicas en aves de producción y se mantiene como una constante amenaza para las aves de corral del patio trasero (Westbury, 2001).

Los principales factores que estarían contribuyendo a que la crianza no tecnificada tenga un mayor riesgo de contacto con el virus de la ENC serían: escaso o nulo nivel de protección de estas aves, alto porcentaje de aves de estas aves no se encuentran vacunadas o tienen insuficiente protección vacunal (Tadesse *et al.*, 2005; Musa *et al.*, 2009). Como medida de control de la ENC, por su eficacia, se ha establecido la vacunación rutinaria contra el virus de todas las aves comerciales. Sin embargo, las aves de traspatio no son sometidas a este procedimiento por razones sociales y económicas (Alexander, 2001; Ananth *et al.*, 2008; Nwanta *et al.*, 2008), a pesar de constituir una fuente de mantenimiento y difusión del virus, que significa un riesgo para la crianza industrial, porque aun cuando la vacunación es total en este tipo de aves, hay muchos factores que pueden conducir a una falla en los programas de vacunación y conducir a la presentación de brotes de la enfermedad (Ferrer, 2005).

En el Perú es obligatoria la vacunación contra el virus de Newcastle, a nivel comercial se cumple. Sin embargo, en la crianza casera, en donde se utilizan mínimos recursos, la

vacunación está a cargo del SENASA es posible que no se cumpla en un 100% por razones sociales, los propietarios evitan todo tipo de manipulaciones con sus aves y porque la vacunación no abarca todas las especies aviares criadas bajo este sistema.

El sistema de manejo en estas aves puede favorecer la infección, el bajo nivel de bioseguridad, las deficiencias nutricionales, la crianza de aves de edades múltiples, y la convivencia, en muchos casos, con especies aviares menos susceptibles que pueden infectarse y no mostrar sintomatología clínica grave como son los patos, pavos, codornices y aves silvestres, pero que sí pueden excretar y diseminar el virus (Tadesse *et al.*, 2005; Musa *et al.*, 2009). La crianza doméstica mayormente es a campo abierto, teniendo fácil contacto con otras especies de vida libre. En este tipo de crianza es posible que ocurra un lento nivel de transmisión entre aves infectadas y sanas debido a la baja densidad poblacional, a la agrupación natural de aves por edades y a la alimentación a campo abierto (Ferrer, 2005).

La compra de pollos en mercados para repoblamiento y la presencia de aves migratorias, mostraron asociación positiva con la ENC (Liu *et al.*, 2009). En el Perú es muy cotidiano, el préstamo de padrillos reproductores entre los pobladores. En los países asiáticos en donde existe grandes mercados de aves vivas, éstos constituyen un gran problema en la epidemiología de la enfermedad, el hacinamiento de aves aunado con la gran variedad de aves que confluyen y el estrés generado que promueve la rápida diseminación del virus (Liu *et al.* 2009).

Se ha descrito la aparente resistencia de estas aves a la enfermedad, pero se reconoce que actúan como importantes portadores y fuentes de infección para la avicultura comercial (Tadesse *et al.*, 2005). Para erradicar la ENC es imprescindible controlar las fuentes de diseminación a través de potenciales reservorios y fuentes de infección (Alexander, 2000; Ananth *et al.*, 2008). En la actualidad existen varios estudios sobre la detección del vENC en aves de traspatio, especialmente en pollos, y en los que se ha podido detectar y aislar el virus.

Alexander (1996) reportó que el total de los 133 brotes ocurridos en 1993 en Alemania fueron en crianzas de traspatio; en tanto que 52 de los 68 brotes durante el periodo 1992/1994 en Bélgica y el 65% de los brotes reportados en 1994 en Portugal se presentaron en aves de traspatio. El principal modo de transmisión parece ser la vía fecal-oral, pues la vía respiratoria juega un rol más importante donde hay mayor concentración de aves (Alexander, 1998). Durante el 2005, Bolivia reportó 707 brotes de la enfermedad de Newcastle en aves de crianza casera. El 5 de julio del 2005, Brasil notificó un brote de esta enfermedad en aves de corral de traspatio, en el estado de Río Grande do Sul, implicando 17 casos y la destrucción de 27 aves. En agosto del 2006, en el estado de Amazonas, hubo un brote que implicó un único caso en aves de traspatio (patos) (OIE, 2006).

Estudios seroepidemiológicos y de aislamiento han demostrado que la cepa velogénica del vENC es endémica en las poblaciones de aves de corral rurales (Spradbrow, 1993; Otim *et al.*, 2004, 2006). En una investigación realizada en el sur de la India se obtuvieron tres cepas de vENC de pollos sanos de crianza de traspatio, que no fueron vacunados contra la ENC. La existencia de vENC con alto IPIC confirma la circulación de virus de Newcastle virulento en pollos de crianza de traspatio, que podría ser un fuente de transmisión para pollos comerciales (Ananth *et al.*, 2008).

Con el fin de evaluar la circulación del virus de la ENC en aves de traspatio no vacunadas en siete municipios del eje cafetero de Colombia. Se analizaron 662 muestras de suero para detectar anticuerpos IgG contra el virus de la ENC por ELISA. El resultado del estudio arrojó una seroprevalencia en la población de aves evaluadas del 30.7% (203/662) (Romero *et al.*, 2008), similar a la establecida en Australia (East *et al.*, 2006) en 753 predios avícolas de traspatio y en Etiopia (Tadesse *et al.*, 2005); pero inferior a los resultados obtenidos en estudios similares efectuados en Nigeria (Musa *et al.*, 2009) por HI (51.9%).

El pato es una de las especies de aves de corral criadas a menudo junto con polluelos bajo condiciones de traspatio (Otim *et al.*, 2006). Estos pueden estar infectados con el vENC y mostrar pocos o ningún signo clínico incluso con cepas letales en pollos, pero son capaces de transmitir el virus (Spradbrow, 2000; Alexander, 2001).

2.11 Enfermedad de Newcastle en el Perú

El sector avícola en la economía nacional representa el 51% del PBI pecuario y 26% del PBI agropecuario, además de generar 280 mil empleos directos a nivel nacional. El consumo per cápita de carne pollo alcanza actualmente los 37 kilos y aporta el 61% de la proteína animal que consume la población (MINAG, 2012).

En el 2005, el Perú fue declarado país libre de Influenza Aviar. Sin embargo, la certificación de país libre de la ENC aún no ha podido ser concretada. Actualmente la Asociación Peruana de Avicultura (APA) trabaja de la mano con el SENASA con el principal objetivo de declarar al Perú como país libre de la ENC (SENASA, 2012).

En 2012, Perú se ubicó entre los 20 productores de pollo más grandes del mundo. El sector avícola ha mantenido una evolución positiva en los últimos años. Así, la producción de carne de ave en el año 2012, incluyendo carne de pollos, gallinas, pavos y patos, alcanzó un millón 168,951 T (Toneladas), representando un incremento de 7.8% respecto al 2011, según cifras del Ministerio de Agricultura (MINAG, 2012).

En el Perú la ENC fue diagnosticada por primera vez en el año 1951. Actualmente la enfermedad está presente, así lo indican estadísticas de los aislamientos del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de San Marcos y reportes del SENASA. En el Perú durante el año 2013, se notificaron seis brotes, correspondientes a Lima, Arequipa y Cusco, que afectaron principalmente a aves de crianza

casera (SENASA, 2013). Es necesario conocer cuáles son los reservorios así como fuentes de contaminación para esta enfermedad. El conocimiento de las especies que al ser infectadas con el vENC son más susceptibles a mostrar signos de enfermedad, y las que, por el contrario, son capaces de eliminar virus de la ENC sin mostrar signos clínicos, tiene un enorme valor para el análisis del riesgo que cada especie impone tanto en la introducción, como en el mantenimiento de la enfermedad en un territorio.

En nuestro país se sospechaba al igual que en otros países de las aves silvestres (Ravina, 2005), por lo que se han realizado estudios buscando niveles de anticuerpos indicadores de reto por el virus de la ENC en aves silvestres de las órdenes *Columbiformes*, *Paseriformes* y *Psittaciformes* en el departamento de Lima, obteniéndose en todos los casos resultados negativos (Carrión, 2000; Shimabukuro, 2000; Chang, 1998). Otros estudios realizados en el Perú, en base a pruebas virológicas como el aislamiento viral, fueron los de Mendoza (2012), y Ventocilla (2011), quienes obtuvieron prevalencias medias de 0.1% y 0.41% respectivamente, estos resultados estarían demostrando que los reservorios de la enfermedad de Newcastle, estarían probablemente en otro tipo de aves, tales como las aves de traspatio o de riña, resaltando la importancia de conocer el rol epidemiológico de estas aves en la diseminación de la enfermedad (Ravina *et al.*, 2005).

Resultados del análisis de monitoreo serológico realizado por el SENASA (2002) en Lima, Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Cuzco, Apurímac y Puno indican alta prevalencia del vENC en aves (*Gallus gallus*) de crianza no tecnificada, y señala a este grupo de aves como los principales hospederos y reservorios del virus en el país (Icochea, 2007). Otro estudio realizado por Santa Cruz (2008), evaluó pavos de crianza familiar en cuatro provincias del departamento de Lima (Lima, Huaral, Huaura y Barranca) encontrando una prevalencia de 3.9%, concluyendo que las aves de crianza de traspatio están expuestas al vENC, y por lo tanto tienen un rol mayor en la epidemiología de la enfermedad (Santa Cruz, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar y tiempo de estudio

El presente estudio se realizó con muestras obtenidas mediante hisopado cloacal de patos procedentes de crianza de traspatio, en dos provincias del departamento de Lima: Huaral y Huaura. Ambas provincias costeras de localización estratégica, pues en dichas zonas existen planteles industriales de aves, concentración de aves de crianza casera (SENASA, datos no publicados). La temperatura media anual es de 19.4 °C y 19.1 °C para Huaral y Huaura respectivamente.

3.2 Tamaño de muestra

Se determinó que para obtener al menos una muestra positiva al aislamiento viral, se tendría que recolectar al menos 298 muestras, este número se obtuvo asumiendo que la prevalencia del virus para esta especie es de al menos 1%. Para determinar el tamaño de la muestra se aplicó el modelo teórico de la distribución binomial.

$$n = \frac{\ln \alpha}{\ln (1-p)}$$

Donde:

n = número de muestras

p= prevalencia crítica del 0.5%

q = 1-p

α = Probabilidad de cero éxitos (1-IC) de 0.05
(Gonzales A, 1987)

Reemplazando: n =298.07

3.3 Animales

Se muestrearon 600 patos de traspatio procedentes de dos provincias del departamento de Lima: Huaral (300) y Huaura (300), sin distinción de sexo o edad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de muestras colectadas y distrito de procedencia

Provincias	Distritos	Número de patos muestreados
Huaral	Chancay	98
	Aucallama	78
	Huaral	100
	Venticiete de Noviembre	24
Huaura	Huara	82
	Sayan	101
	Santa Maria	43
	Vegueta	40
	Huacho	24
	Hualmey	10
Total		600

4.3 Colección y procesamiento de las muestras

Las visitas a las viviendas de crianza con crianza de traspatio se realizaron a partir de las 8 am hasta las 3pm, con el fin de poder muestrear la mayor cantidad de viviendas. Una vez que se nos permitía el ingreso al predio, se procedía a la captura al azar del ave e inmediatamente se tomaba la muestra.

Las muestras fueron obtenidas por hisopado cloacal, las cuales fueron sumergidas en crioviales estériles conteniendo un medio de cultivo celular enriquecido al 5% con suero de

riñón bovino, para después dejar en libertad a las aves. Las muestras fueron posteriormente homogenizadas, rotuladas adecuadamente e introducidas en una caja térmica con gel refrigerante para su conservación a 4°C, siendo transportadas inmediatamente al laboratorio una vez finalizado el muestreo. Todos los procesos del aislamiento viral se realizaron en el Laboratorio de Patología Aviar de la UNMSM, en el área de aislamiento viral de acceso restringido

3.5 Procesamiento de las muestras

3.5.1 Aislamiento viral

El aislamiento viral se realizó mediante inoculación en huevos embrionados SPF, en la cavidad alantoidea de embriones de pollo de 9-11 días de edad. Este procedimiento se llevó a cabo al día siguiente del muestreo mientras tanto las muestras fueron mantenidas bajo refrigeración, registrándose las mismas en una base de datos.

Todos los procesos del aislamiento viral se realizaron en el Laboratorio de Patología Aviar de la UNMSM, en el área de aislamiento viral de acceso restringido, que cuenta con una cabina de bioseguridad de clase II, haciendo uso de guantes mascarilla y mandiles descartables.

Para el aislamiento viral se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Con la ayuda de un vórtice, se homogenizaron las muestras individualmente por 15 segundos cada una.
2. Se colectó 200ul de cada muestra para formar grupos de 5 muestras cada uno, haciendo un volumen total de 1 ml aproximadamente por grupo, rotulándose cada uno con el código correspondiente.
3. Se centrifugaron los tubos conteniendo las muestras a 1000g por 10 minutos.

4. Se retiraron los tubos de la centrifuga cuidadosamente y se colectó el sobrenadante en otro tubo correctamente rotulado.
5. Una vez colectado el sobrenadante se aplicó solución antibiótica en un volumen de 0.05 ml de penicilina-estreptomicina al 20% por ml de muestra.
6. Se incubaron las muestras de dos a tres horas a 4°C.
7. Se procedió a recolectar las muestras en jeringas individuales estériles, e inocularlas en embriones SPF de 9-10 días de edad. Empleando un ovoscopio se identificó el punto de inoculación de 2mm sobre la línea de la cámara de aire, en la zona menos vascularizada del embrión.
8. Se desinfectó la zona con yodo y se procedió a perforar la cáscara.
9. Se inyectó 0.2 ml del inóculo, en el saco alantoideo del embrión, empleándose 5 huevos embrionados por cada grupo formado.
10. Se sellaron los embriones con parafina, colocándolos finalmente dentro de la incubadora a 37 °C durante 6 días.
11. Se realizó el miraje de los huevos diariamente registrándose la mortalidad y el tiempo de muerte transcurrido tras la inoculación. Los huevos con embriones muertos fueron mantenidos en refrigeración hasta el día de la evaluación.
12. Aquellos embriones que sobrevivieron fueron sacrificados por refrigeración al sexto día.

3.5.2 Evaluación de la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo

El fluido alantoideo de los huevos que murieron después de la inoculación, los moribundos y todos los embriones que permanecieron vivos hasta el periodo final de la incubación se utilizaron para evaluar la actividad hemaglutinante frente a eritrocitos de pavo 0.7%.

Brevemente, el proceso se describe de la siguiente forma:

1. Se hizo una incisión en la cáscara del huevo, por encima de la cámara de aire, con una tijera, se removió la cáscara que conforma la cámara de aire.
2. Haciendo uso de una pipeta colectora y con la ayuda de una pinza estéril, se recolectó 45 uL del líquido alantoideo de cada embrión, colocándolo en una lámina porta objetos. Se enfrentó el líquido alantoideo con 45 uL de glóbulos rojos al 0.7%.
3. Se homogenizó la muestra esperando unos minutos para observar si la hemaglutinación (HA) era positiva.
4. Las muestras con HA positivas fueron enfrentadas a un suero anti vENC para inhibir la hemaglutinación.
5. Las muestras con hemaglutinación negativa, se les realizó un segundo pasaje en huevos SPF repitiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente.

3.6 Análisis estadísticos

La presencia de una o más muestras positivas indicaría que el virus está presente con una prevalencia de al menos el 1%. Los datos obtenidos fueron sometidos a la técnica de evaluación de riesgo por simulación de Monte Carlo, las proporciones se expresaron con un intervalo de confianza al 95%. El cálculo de los intervalos se realizó empleando simulaciones estocásticas basadas en distribución beta. Dicha simulación esta implementada en el paquete estadístico @Risk en el entorno de una planilla electrónica Excel XP.

IV. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron un total de 600 muestras de hisopados de cloaca de patos procedentes de crianza de traspatio en las provincias de Huaral y Huaura. Para su análisis, las muestras fueron agrupadas en *pools* de acuerdo a la zona de procedencia y a la fecha en la cual se realizó el muestreo.

En el Cuadro 2. Se presentan los resultados de la prueba de HA (Hemaglutinación), el número de muestras colectadas y el distrito de procedencia. Como se puede observar 10 de las 300 muestras fueron positivas a la hemaglutinación.

Cuadro 2. Número de muestras colectadas, el distrito de procedencia y resultados de la prueba de hemaglutinación (HA).

Distrito	N° Muestras recolectadas	N° Muestras HA+
Chancay	98	4
Aucallama	78	1
Huaral	100	1
Veintisiete de Noviembre	24	0
Huaura	82	1
Sayan	101	1
Santa María	43	0
Vegueta	40	2
Huacho	24	0
Hualmey	10	0
Total	600	10

HA+: Muestras positivas a hemaglutinación

Según nuestros resultados, las muestras que tuvieron hemaglutinación positiva procedieron de los siguientes distritos: cuatro de Chancay, dos de Vegueta, una de Aucallama, una Sayan, una de Huaral y otra de Huaura (**Cuadro 2**).

Cuadro 3. Resultados de la prueba de Inhibición de la hemaglutinación usando suero específico al Paramixovirus Aviar Tipo-1.

Distrito	N° muestras HA+	Resultados HI	
		Positivos	Negativos
Chancay	4	0	4
Aucallama	1	0	1
Huaral	1	0	1
Huaura	1	0	1
Sayan	1	0	1
Vegueta	2	0	2
Total	10	0	1

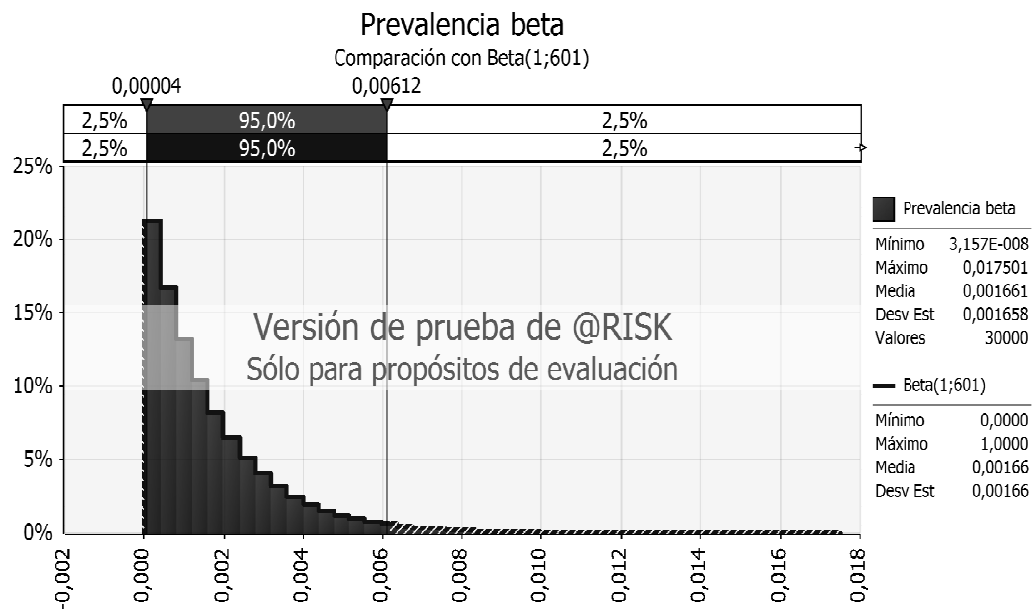
HA+: Muestras positivas a hemaglutinación

HI: Inhibición de la hemaglutinación

Todas las muestras con hemaglutinación positiva, resultaron negativas a la Inhibición de la hemaglutinación, significando que no se pudo aislar el PMAV-1 de los patos de traspatio. Según los resultados de las pruebas de Inhibición de la hemoaglutinación (Cuadro 3).

Los resultados de prevalencia se estimaron por medio de simulación beta implementada en el paquete estadístico @Risk en el entorno de una plantilla Excel XP. La prevalencia media fue de 0.1% con un intervalo de confianza de 0.004 y 0.6% (Figura 1).

Figura 1. Distribución de la probabilidad de prevalencia del vENC en patos de traspatio, en las provincias de Huaral y Huaaura, con intervalos de confianza del 95%.



V. DISCUSIÓN

Desde 1926, año en que se descubrió la Enfermedad de Newcastle han ocurrido tres panzootias a nivel mundial; en el Perú, se encuentra presente desde el año 1951 y hasta la actualidad no ha podido ser erradicada, constituyendo una de las amenazas más importantes para la industria avícola. Son frecuente los brotes en pollos de carne, postura y en los últimos años se viene incrementando en aves de crianza de traspatio. Se asumió en los últimos años que las aves silvestres podrían ser importantes reservorios de la enfermedad, las investigaciones indican que probablemente los reservorios o fuentes de infección estén en otro tipo de aves de traspatio. Las estrategias e intervenciones nacionales e internacionales vienen implementando estrictas medidas de bioseguridad y vacunación, así como la identificación de posibles fuentes de contaminación que constituye un potencial riesgo para la diseminación de la enfermedad.

Una característica de la crianza de traspatio es el pastoreo de aves en terrenos abiertos, donde entran en contacto directo con otras especies aviares domésticas o silvestres, con sus plumas, excretas u otros desechos. Esta interacción entre aves domésticas, fauna silvestre, mascotas aviares e incluso con personas puede contribuir al riesgo de transmisión horizontal de esta enfermedad. Además bajo este sistema de crianza existen muchas deficiencias de manejo, alimentación y control de enfermedades. Martins (1991), menciona que el virus se mantiene endémico mientras encuentre aves susceptibles. Las aves susceptibles son las que se incorporan al criadero después del nacimiento, aves no vacunadas o insuficientemente protegidas que ingresan por préstamo, compra, canje, o aves del mismo criadero que no se han infectado. La convivencia entre dichas aves genera un círculo de diseminación viral continuo dentro de la crianza de traspatio. La convivencia con especies de aves que pueden infectarse sin mostrar sintomatología clínica pero que excretan y diseminan el virus, como son los patos, representaría un mayor riesgo de infección por el vENC.

En el Perú, la carne de pato forma parte importante en la gastronomía peruana, y esto ha hecho que el pato criollo sea una de las especies aviares más frecuentes criadas a menudo junto pollos, gallinas y bajo condiciones de traspatio. Para iniciar un programa de vigilancia en patos de traspatio donde es desconocida la situación del virus de Newcastle, el primer ideal es evaluar la presencia del virus y establecer su prevalencia. La importancia del monitoreo de patos de traspatio es debido a que son potenciales fuentes de infección para la avicultura comercial y la crianza de traspatio (Tadesse *et al.*, 2005) ya que estas aves generalmente no muestran signos clínicos después de la infección, incluso con cepas letales para pollos (Spradbrow, 2000; Alexander, 2001).

El presente trabajo es el primero que evalúa la presencia del vENC en patos de traspatio. En nuestro estudio se analizaron un total de 600 muestras de hisopados cloacales de patos, para determinar la presencia o no del vENC. Se llevó a cabo el procedimiento de aislamiento viral que permite la caracterización del virus aislado. La presencia del vENC fue determinada por la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo, y confirmada mediante la prueba de Inhibición de la hemaglutinación, 10 muestras fueron positivas para HA; sin embargo, posteriormente a la prueba de HI fueron negativas. Si bien es cierto que el estudio realizado no demostró la presencia del virus en patos de traspatio, se obtuvieron muestras positivas a la hemaglutinación. En patos existen otros virus con propiedades hemaglutinantes, habiéndose descrito algunos PMAV-4,-6 y -9) y también es común la infección subclínica con el adenovirus causante del Síndrome de Baja de Postura.

Estudios previos han demostrado que los patos domésticos pueden ser fuentes importantes para el vENC. Un estudio durante los años 2002-2007, aisló 201 cepas del vENC en patos, en mercado de aves vivas en China, mostrando claramente que esta ave puede actuar como importante reservorio del virus (Liu *et al.*, 2009). Zhang *et al* (2011b), llevo a cabo un estudio serológico y virológico en granjas de patos en China para detectar la infección con el vENC velogénico, el 35.7 % fueron positivos a anticuerpos, y se aislaron tres cepas del vENC

velogénicas. Otra investigación determinó que el vENC persistió mucho tiempo en una crianza de patos en condiciones de traspatio en Indonesia (Kingston y Dharsana, 1994). En el Perú, también se han realizado estudios. Santa Cruz (2008), evaluó pavos de crianza familiar en cuatro provincias del departamento de Lima (Lima, Huaral, Huaura y Barranca) encontrando una prevalencia de 3.9%, concluyendo que las aves de crianza de traspatio están expuestas al vENC, y por lo tanto tienen un rol mayor en la epidemiología de la enfermedad (Santa Cruz, 2008)

En Vietnam, cepas del vENC virulentas para pollos fueron aisladas de patos (Spradbrow, 2000). En Tailandia (2004) el vENC fue confirmado en pollos, patos y gansos (OIE, 2005). En Sudamérica, ha sido reportado un brote de la ENC en patos de traspatio en Brasil en el 2005 (OIE, 2006). En china los brotes en patos se presentan desde los años 90.

Otros reportes, encontraron similares resultados al presente estudio. Yu-Pin *et al.* (2005) analizó 230 muestras de aves silvestres, resultando negativas al aislamiento viral, aun cuando 11 de las mismas aves fueron positivas a anticuerpos. Un estudio de prevalencia del vENC en aves silvestres y en cautiverio en Nigeria, no logró aislar virus de ningún Anseriforme (Ibu *et al.*, 2009).

En nuestro país no existen trabajos previos de aislamiento y prevalencia viral para la ENC en patos de traspatio, pero existen estudios virológicos en aves silvestres en la que no se logró aislar el vENC. Mendoza (2012), evaluó el virus de Newcastle en aves silvestres de la laguna “Albufera” mediante aislamiento viral obteniendo resultados negativos. Así mismo, el Servicio Agrícola Ganadero de Chile, analizo 346 muestras de aves migratorias y silvestres para la ENC obteniendo resultados negativos al aislamiento viral en su totalidad. Otros estudios de tipo serológico realizados en el Perú; Chang (1998), no encontró niveles de anticuerpos compatibles con la ENC en aves silvestres passeriformes y columbiformes. Asimismo un estudio realizado en el zoológico del parque de las Leyendas, no encontró ningún psitácida positiva a

anticuerpos contra el virus (Shimabukuro, 2000), similar a lo encontrado por Carrión (2000), en aves columbiformes en la provincia de Huaral.

Se han señalado desventajas en el método de aislamiento viral del vENC en aves silvestres, una de ellas es debido al bajo índice de aislamientos que se consigue con este método, esto se debe mayormente al grado de frescura, al almacenamiento y mantenimiento de las muestras que pueden hacer que se pierda la viabilidad del virus presente en las mismas (Yupin, *et al.*, 2005).

Nuestros resultados indicarían que durante el periodo de estudio verdaderamente el virus no estuvo presente en patos de traspatio en las provincias evaluadas, o que no se logró aislar el virus debido a la baja carga de eliminación viral o, la no coincidencia del momento de la toma de muestra con el tiempo de eliminación viral, ya que esta especie elimina el virus en periodos cortos y de manera intermitente. Por otra parte, el tamaño muestral se basó en la suposición que la prevalencia del virus circulante fuera de al menos de 1%. Sin embargo, la prevalencia pudo ser más baja, por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el virus de Newcastle puede encontrarse presente en menos del 1% en patos de crianza de traspatio de las provincias evaluadas.

Todas las aves muestreadas del estudio fueron aparentemente sanas y no manifestaron ningún signo clínico compatible con la enfermedad (respiratorios, digestivos o nerviosos). Tampoco se detectaron lesiones de ningún tipo en los embriones inoculados con las muestras de hisopados de cloaca, al primero o segundo pasaje. Durante el tiempo que duró la fase de colección de muestras, se pudo constatar que en la crianza de traspatio existen muchos factores de riesgo para la transmisión horizontal del virus. Se pudo observar aves silvestres en los patios traseros, crianza de aves de riña en un mismo ambiente que patos y gallinas, presencia de guacamayos, periquitos, lechuzas, palomas, gansos, entre otros, se evidenció que se realizan préstamos de patos padrillos y no se permite la vacunación. Además se observaron granjas de

crianza comercial cerca a los criaderos de traspatio y a los humedales donde confluyen tanto aves silvestres residentes como migratorias que también intervienen en la diseminación del virus.

VI. CONCLUSIONES

En el presente estudio realizado se analizaron 600 muestras de hisopado cloacal procedentes de patos de crianza de traspatio de las provincias de Huaral y Huaura, no se logró aislar el virus de la Enfermedad de Newcastle mediante la técnica de aislamiento viral. Estos resultados sugieren, que el virus estuvo presente en menos del 1% que fue la prevalencia referencial.

Los resultados de prevalencia estimados por medio de la simulación beta indicó una prevalencia media de 0.1% con una intervalos de confianza entre 0.004 y 0.6%, siendo estos valores muy bajos para considerar a las aves en estudio como un reservorio o posible fuente de infección hacia la aves domésticas.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Alva B. 2001.** Newcastle velogénico, siempre un tema de actualidad. En: Memorias XXIV Reunión Científica anual APPA. Lima, Perú Asociación Peruana de Producción Animal.
2. **Aldous E, Alexander D. 2001.** Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1. Avian Pathology. 30:117-128.
3. **Alexander D, Bell J, Alders R. 2004.** Tecnology review: Newcastle disease with special emphasis on its effect on village chickens. FAO Animal Production and Health. Rome. 110-135 p.
4. **Alexander, D. 2003.** Newcastle Disease and Other Avian Paramixoviridae Infecctions. En: Diseases of Poultry, Cap 2. 11° Edition. Saif, Barnes, Glisson, Fadly, Mc Dougald, Swayne (eds.). AAAP Iowa State University – USA. p 63-87.
5. **Alexander, D. 2001.** Newcastle disease. British Poultry Science, 42:5-22.
6. **Alexander, D. 2000.** Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Rev Sci Tech; 19 (2): 443-62.
7. **Alexander D, Morris H, Pollitt W; Sharpe C; Eckford R; Sainsbury R, Mansley L, Gough R, Parsons G. 1998.** Newcastle disease outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. The Veterinary Record, 143:209-212.

8. **Alexander, D. 1997.** Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M., eds. Iowa State University Press, Iowa, USA. p 541–570.
9. **Alexander D, Campbell G, Manvell R, Collins M, Parsons G, McNulty M. 1992.** Characterization of an antigenically unusual virus responsible for two outbreaks of Newcastle disease in the Republic of Ireland in 1990. The Veterinary Record, 130:65–68.
10. **Ananth R, Kirubaharan J, Priyadarshini M, Albert A. 2008.** Isolation of Newcastle disease viruses of high virulence in unvaccinated healthy village chickens in South India. Inter J Poult Sci; 7(4):368-373.
11. **Angulo E. 1998.** Interpretación biológica acerca de la domesticación del pato criollo (*Cairina moschata*). Bull. Inst. Etudes andines. 27(1):17-40.
12. **Antillon A. 2005.** Enfermedad de Newcastle: XVII curso Avimex de Salud y Productividad. Enfermedades Virales de Alto Impacto en la Avicultura. 29 Julio. México D. F. 27-43 p.
13. **Avilez J, Camiruaga M. 2006.** Manual de crianza de patos. 1ª ed. Chile. Uc Temuco. 13-14 p.
14. **Awan M, Otte M, James A. 1994.** The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. Avian Pathology, 23:405-423.
15. **Baez J. 1994.** Enfermedad de Newcastle. Ed Trillas México. En: Patología de las aves. p 15-18.

16. **Barbezange C, Jestin V. 2002.** Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals. J. of Virological Methods, 106:197-207.

17. **Brown I, Alexander D. 2003.** Newcastle disease. II Seminario Internacional Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle “Estandarización de Criterios Sanitarios para el Comercio” ALA – OIE. 13 – 15 de agosto. Lima – Perú.

18. **Capua I, Alexander D. 2009.** Ecology and Epidemiology of Newcastle Disease. Avian Influenza and Newcastle Disease. A Field and Laboratory Manual.p 19-26.

19. **Capua I, Alexander D. 2004.** Human health implications of avian influenza viruses and paramyxoviruses. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23:1-6.

20. **Capua I, Dalla P, Mutinelli F, Marangon S, Terregino C. 2002.** Newcastle disease outbreaks in Italy during 2000. The Veterinary Record, 150:565-568.

21. **Carter G, Wise D, Flores E. 2005.** Paramyxoviridae. En: A Concise Review of Veterinary Virology. Internacional Veterinary Information Services, Ithaca, Nueva York (www.ivis.org Documento N° A2418.0905).
 [Internet], [28 Noviembre 2013]. Disponible en:
<http://www.ivis.org/advances/Carter/Part2Chap18/chapter.asp?LA=1>

22. **Carrión, A. 2000.** Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres del orden *columbiforme* en Baños de Boza, distrito de Okayama, provincia de Huaral. Tesis bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima. 35p.

23. **Chang E. 1998.** Detección de la prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres passeriformes y columbiformes en la provincia de Chancay. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor San Marcos. 14 p.
24. **Creelan J, Graham G, McCullough S. 2002.** Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 (APMV-1) from field cases using one step RT-PCR. Avian Pathol. 31(5):493-499.
25. **Cuello S, Vega A, Noda J. 2011.** REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 12(6) REDVET. [Internet], [28 noviembre 2013].
Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/636/63622160010.pdf>
26. **Czegledi A, Ujvari E, Somogyi E, Wehmann O, Werner B, Lomniczi B. 2006.** Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. Virus Res. 120:36-48.
27. **Dai Y, Liu M, Cheng X, Shen X, Wei Y, Zhou S, Ding C. 2012.** Infectivity and Pathogenicity of Newcastle Disease Virus Strains of Different Avian Origin and Different Virulence for Mallard Ducklings. Avian diseases, 57(1), 8-14.
28. **De Leeuw O, Hartog L, Koch G, Peeters B. 2003.** Effect of fusion protein cleavage site mutations on virulence of Newcastle disease virus: non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. J Gen Virol 84:475-484.

29. **De Leeuw O, Peeters B. 1999.** Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. J. Gen. Virol. 80:131-136.
30. **Docherty D, Friend M. 2001.** Newcastle disease. En: Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds. Friend, M; Franson, C (eds.) Chapter 21. USGS – US Geological Survey – US Department of the Interior. Washington D.C.
- [Internet], [12 Agosto 2013]. Disponible en:
http://www.nwh.usgs.gov/pub_metada/field_manual/chapter_21.pdf
31. **Domanska K, Smietanka K, Minta Z. 2005.** Comparison of RT-PCR and virus isolation for detection of Newcastle disease virus in experimentally infected chicken. 14th World Veterinay Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey. 366 p.
32. **East I, Kite V, Daniels P, Garner G. 2006.** A cross-sectional survey of Australian chicken farms to identify risk factors associated with seropositivy to Newcastle-disease virus. Preventive Vet Med; 77:199-214.
33. **Estudillo J. 2000.** Algunas consideraciones sobre la enfermedad de Newcastle. “Enfermedades Emergentes: Enfermedad de Newcastle”. Cap. 6. Productores avipecuarios. México D.F
34. **Esperón F, Vázquez B, Sánchez A, Fernández-Piñero J, Yuste M, Neves E, Nogal V, Muñoz M. 2014.** Seroprevalence of Paramyxoviruses in Synanthropic and Semi-Free-Range Birds. Avian Diseases: 58(2):306-308.

35. **FAO. 2013.** Red Internacional para el Desarrollo de la Avicultura Familiar.
Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Roma.
[Internet], [24 junio 2013].
Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/infpd/home.html>
36. **FAO. 2004.** A technology review: Newcastle disease with special emphasis on its effects on village chickens. [Internet], [25 junio 2013].
Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/y5162e/y5162e00.HTM>
37. **Fehervari T. 2000.** Estrategias y control de la enfermedad de Newcastle en otros países.
En Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle. Ed. by DPA: Aves, FMVZ, UNAM. Mexico D.F. p 1-6.
38. **Ferrer R. 2005.** Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en *Gallus gallus* de Lima. Estudio de caso-control. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor San Marcos 22-25 p.
39. **Gerlach H. 1994.** Disease etiologies: Viruses. En Avian Medicine: Principles and applications. Section five. B.W. Ritchie; G. J. Harrison; L.R. Harrison (eds). Florida, Wingers Publishing Inc. 920-929 p.
40. **Gonzales A, 1987.** Presencia de anticuerpos de Influenza A en aves. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor San Marcos. 10-11 p.
41. **Hanson B, Swayne D, Senne D, Lobpries D, Hurst J, Stallknecht D. 2005.** Avian influenza viruses and paramyxoviruses in wintering and resident ducks in Texas. Journal of Wildlife Diseases, 41:624-628.

42. **Heckert R. 1996.** Newcastle disease in cormorants. The Canadian Veterinary Journal. La Revue vétérinaire canadienne 34:184-186.
43. **Hietala S, Hullinger P, Crossley B, Kinde H, Ardans A. 2004.** Enviromental air sampling to detect exotic Newcastle disease virus in two California comercial poultry flocks. J Vet Diagn Invest. Mar; 17(2):198-200.
44. **Hoerr F. 2004.** Newcastle disease. Curso de Fisiopatología Aviar – UNMSM – FMV. 18-20 noviembre. Lima – Perú.
45. **Huang Z, Panda A, Elankumaran S, Govindarajan D, Rockemann D, Samal S. 2004.** The hemagglutinin-neuriminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. J. of Virology, 78(8): 4176-4184.
46. **Ibu O, Okoye1 J, Adulugba E, Chah1 S, Shoyinka1 E, Salihu A, Chukwuedo A, Baba S. 2009.** Prevalence of Newcastle Disease Viruses in Wild and Captive Birds in Central Nigeria. International Journal of Poultry Science 8 (6): 574-578.
47. **Icochea E. 2007.** Relación entre las aves silvestres y la Enfermedad de Newcastle. Tesis para optar el grado de Magister. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 44-49 p.
48. **Jeria J, Rivera A, Max V, González Á, Moreno V, Jara C. 2007.** Informe epidemiológico final: Detección de un brote de la enfermedad de Newcastle (ENC) en aves marinas, en la zona costera de Constitución, Región del Maule, Chile. [internet] [fecha 10 de enero de 2014].

Disponible en:

http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_9_I_semestre_2009/articulos/informe_final_ENC_2007.pdf.

49. **Jordan F. 1990.** Paramyxoviridae (Newcastle disease and Others). En: Poultry Diseases. 3rd Edition. Bailliere Tindal: Londres: 121-136 p.
50. **Kim L, King D, Curry P, Suarez D, Swayne D, Stallknecht D. 2007a.** Phylogenetic diversity among low virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. Journal of Virology, 81:12641-12653.
51. **Kim M, King D, Suarez D, Wong C, Afonso C. 2007b.** Characterization of Class I Newcastle disease Virus Isolates from Hong Kong Live Bird Markets and detection using realtime. Reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 45: 1310-1314.
52. **Kimball J. 1990.** Introduction to immunology. New York, Macmillan Publishing company. 3ra ed. 42-46 p.
53. **Kinde H, Hullinger P, Charlton B, McFarland M, Hietala S, Velez V, Case J, Garber L, Wainwright S, Mikolon A, Breitmeyer R, Ardans A. 2005.** The isolation of exotic Newcastle disease (END) virus from nonpoultry avian species associated with the epidemic of END in chickens in southern California: 2002-2003. Avian Dis. 49(2):195-198.
54. **King D, Kommers G, Seal B, Brown C. 2002.** Biological and molecular characterization of recent Newcastle disease virus isolates before and after passage in chickens. AAAP/AVMA Scientific Program. Nashville, Tennessee. 8 p

55. **King D. 1999.** Enfermedad de Newcastle. XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura por la Alimentación del Futuro. APA-ALA del 21 – 24 de septiembre. Lima-Perú.
56. **Kingston D, Dharsana R. 1994.** Newcastle disease virus infection in Indonesian ducks. Philippines. Journal of Veterinary Medicine 18:125–130
57. **Kommers G, King D, Seal B, Brown C. 2003.** Virulence of six heterogeneous-origin Newcastle disease virus isolates before and after sequential passages in domestic chickens. Avian Pathol 32:81-93.
58. **Lee E, Jeon W, Kwon J, Yang C, Choi K. 2009.** Molecular epidemiological investigation of Newcastle disease virus from domestic ducks in Korea. Veterinary Microbiology 134: 241-248.
59. **Li Y, Zhang M. 2004.** Rapid pathotyping of Newcastle disease virus from allantoic fluid and organs of experimentally infected chickens using two novel probes. Arch. Virol 149:1231-1243.
60. **Liu H, Chen F, Zhao Y, Zheng D, Li J. 2010.** Genomic characterization of the first class I Newcastle disease virus isolated from the mainland of China. Virus Genes 40: 365–371.
61. **Liu X, Wang X, Wu S, Hua Y. 2009.** Surveillance for Newcastle disease viruses in domestic ducks (*Anas platyrhynchos* and *Cairina moschata*) at live bird markets in Eastern China and characterization of the viruses isolated. Avian Pathol. 38:377-391.

62. **Liu X. 2007.** Role that domestic waterfowl play in the evolution and epidemics of influenza A and Newcastle disease viruses. In W.S. Chen, C.X. Wang & Z.D. He (Eds.), High-Grade Forum for Domestic Waterfowl Development. p 1-8.
63. **Liu X, Wan H, Ni X, Wu Y, Liu W. 2003.** Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. Archives of Virology 148:1387-1403.
64. **Maho A, Boulbaye N, Etobia J. 2000.** La enfermedad de Newcastle y las parasitosis en la cría familiar de aves en el sur de Chad. Laboratorio de Investigación Veterinaria y Zootecnica de Farcha. INFPD Newsletter vol. 10 N° 1 y 2. [Internet], [05 junio 2013]. Disponible en:
<http://www.fao.org/ag/aga/agap/lpa/fampo1/infpd101es.htm>
65. **Martins P. 2003.** Impacto económico de las enfermedades avícolas de la lista “A” de la OIE. II Seminario Internacional Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle “Estandarización de Criterios Sanitarios para el Comercio” del 13-15 de agosto. Lima – Perú.
66. **Mebatsion T, De Vaan L, De Haas N, Romer-Oberdorfer A, Braber M. 2003.** Identification of a mutation in editing of defective Newcastle disease virus recombinants the modulates P-gene Mrna editing and restores virus replication and pathogenicity in chicken embryos. J. of Virology 77 (17):9259-9265.
67. **Mendoza L. 2012.** Evaluación constante del virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres de la Laguna Albufera de Medio Mundo. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor San Marcos. 26 p.

68. **Miller P, Afonso C, Spackman E, Scott M, Pedersen J, Senne D, Brown J, Fuller C, Uhart M, Karesh W, Brown I, Alexander D, Swayne D. 2010.** Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype-10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.* 84 (21):11496–11504.
69. **Miller, P; King, D; Suarez, D. 2005.** Quantification of Newcastle disease virus by real time RT-PCR. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 16-20. Minneapolis-Minnesota. 75 p.
70. **MINAG, 2012. Lima: Ministerio de Agricultura.** [Internet], [12 Octubre 2012]. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/portal/notas-de-prensa/notas-de-prensa-2012/7635-politica-agraria-competitividad-campo>
71. **Morrison T. 2003.** Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1614:73-84.
72. **Murphy F, Gibbs E, Horzinek M, Studdert M. 1999.** Paramyxoviridae. In: *Veterinary Virology*, Chapter 26, 3ra. Ed. Academic Press, Inc., p 405-458.
73. **Musa U, Abdu P, Umoh J, Saidu L. 2009.** Seroprevalence seasonal occurrence and Seroprevalence, seasonal occurrence and clinical manifestation of Newcastle disease in rural household chickens in Plateau State, Nigeria. *Inter J Poult Sci*; 8 (2): 200-204.
74. **Nanthakumar T, Kataria R, Tiwari A, Butchaiah G, Kataria J. 2000.** Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet. Res. Comm.* 24:275-286.

75. **Narvaiza I. 2008.** El pato criollo (*Cairina moschata*). Venezuela. 1ª ed. p 12-13.
76. **Nwanta J, Abdu P, Exema W. 2008.** Epidemiology, challenges and prospects for control of Newcastle disease in Village poultry in Nigeria. *Worlds Poult Sci J*; 64: 119-127.
77. **Ogasawara T, Gotoh B, Susuki H, Asaka J, Shimokata K, Rott R, Nagai Y. 1992.** Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *The EMBO Journal*, 11:476-472.
78. **OIE. 2012.** Terrestrial Manual 2012. Chapter 2.3.14. Newcastle disease. [Internet], [04 mayo 2013]. Disponible en:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
79. **OIE. 2009.** Terrestrial Manual 2009. Chapter 2.3.14. Newcastle disease. [Internet], [02 octubre 2013]. Disponible en:
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
80. **OIE. 2008.** Summary of Immediate notifications and Follow-ups - 2008. Full report about highly pathogenic avian influenza in Egypt. [Internet], [03 junio 2013]. Disponible en:
http://www.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=7012
81. **OIE. 2006.** 18ª Conferencia de la Comisión Regional de la OIE para las Américas Florianópolis (Brasil), 28 de noviembre -2 de diciembre de 2006. [Internet], [24 junio 2013]. Disponible en:
<http://www.oie.int/doc/ged/D3756.PDF>

82. **OIE. 2005.** Inform on the world animal health situation in all transparency. [Internet], [24 junio 2013]. Disponible en:
http://www.oie.int/eng/info/en_info.htm
83. **OIE. 2004.** Newcastle Disease. Cap. 2.1.15. En: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial animals. [Internet], [26 junio 2013]. Disponible en:
<http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A.00038.htm>
84. **OIE. 2002.** Enfermedad de Newcastle. [Internet], [20 junio 2013]. Disponible en:
http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_A160.htm
85. **Oliveira J, Schiavo P, Doretto J, Orsi M, Mazur C, Andrade C. 2005.** Isolamento e caracterização biológica da amostra JAP99 do vírus da doença de Newcastle isolada de patos domésticos (*Neta sp*) no Rio de Janeiro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.4, p 948-951.
86. **Omar A, Bejo M, Ideris A, Yusoff K. 2005.** Development of Sybr Green i based real-time PCR assays for the detection of virus infections in chickens. 14th World Veterinary Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey.
87. **Onapa M, Christensen H, Mukiibi G, Bisgaard M. 2006.** A preliminary study of the role of ducks in the transmission of Newcastle disease virus to in-contact rural free-range chickens. *Tropical animal health and production*, 38(4):285-289.
88. **Otim M, Kabagambe E, Mukiibi-Muka G, Christensen H, Bisgaard M. 2006.** A prospective study of risk factors for Newcastle disease in rural free-range chickens. *Preventive Veterinary Medicine* (in press).

89. **Otim M, Christensen H, Jorgensen P, Handberg K, Bisgaard M. 2004.** Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease virus isolates from recent outbreaks in eastern Uganda. *J. of Clin. Microbiol.* 42(6):2802-2805.
90. **OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2003.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *Virosis. Publicación Científica y Técnica* No. 580. 3° Ed. 2:168-173.
91. **Pedersen J, Senne D, Woolcock P, Kinde H, King D, Wise M, Panigraphy B, Seal B. 2004.** Phylogenetic relationships among Virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J. Clin. Microb.* 42:2329-2334.
92. **Peeters B, De Leeuw O, Koch G, Gielkens A. 1999.** Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *Journal of Virology*, 73: 5001-5009.
93. **Ravina P. 2005.** Monitoreo Serológico de la Enfermedad de Newcastle efectuado en aves domesticas (*Gallus gallus*) en Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Cuzco, Apurímac, Puno-2001. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 13 p.
94. **Rodríguez L, Vargas O, Guevara M, Solano M. 2009.** Molecular analysis of an isolated Newcastle disease virus strain obtained from cloacal swabs in healthy poultry farm in Costa Rica. *Revista Electronica de Veterinaria* [Internet], [20 septiembre 2013]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109/110905.pdf>

95. **Romero M, Narváez W, Sánchez J. 2008.** Newcastle disease in village chickens in the Colombian coffee area. *Journal of Poultry Sci.* 7(4): 368-373

96. **Rovid A, James A, Roth J, Galyon J, Lofstedt M. 2010.** Enfermedades emergentes y exóticas de los animales. 1ª Ed. Iowa State University. p 150-154.

97. **Sakai K, Sakabe G, Tani O, Watanabe Y, Jahangir A, Nakamura M, Takehara K. 2007.** Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from Northern Pintail (*Anas acuta*) in Japan. *J. Vet.* 69: 1307–1311.

98. **Sánchez F, Vizcaíno B. 2011.** Desarrollo de modelos epidemiológicos para el análisis del riesgo de entrada de los virus de Influenza Aviar altamente patógena y la Enfermedad de Newcastle en España. Tesis para optar al grado de Doctor. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 96 p.

99. **Santa Cruz F. 2008.** Prevalencia de anticuerpos contra Paramyxovirus aviar tipo 1 en pavos de crianza familiar en cuatro provincias de Lima, Perú. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor San Marcos. p 45-66

100. **Seal B, Wise M, Pedersen J, Senne D, Alvarez R, Scott M, King D, Yu Q, Kapczynski D. 2005.** Genomic sequences of low virulence avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Veterinary Microbiology.* 106(1-2):7-16.

101. **Seal B, Crawford J, Seller H, Locke D, King D. 2002.** Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res.*, 83:119-129.

- 102.** *SENASA. 2013.* Boletín epidemiológico SENASA. Lima: Ministerio de Agricultura. [Internet], [30 Marzo 2014]. Disponible en:
http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&P
- 103.** *SENASA. 2004.* Plan Estratégico para la creación del Programa Nacional de Sanidad Avícola. Ministerio de Agricultura. Lima. [Internet], [15 julio 2013].
Disponible en:
http://www.senasa.gob.pe/sanidad_animal/pn_sanidad_avicola/red_nac_cri_pat/pla_est_pronasa.pdf
- 104.** *Senne D. 2003.* Exotic Newcastle disease virus characterization. Proceedings of the fifty second western poultry disease conference. Sacramento, California, March 8-11, p 28-30.
- 105.** *Senthuran S, Vijayarani K, Kumanan K. 2005.* Pathotyping of Newcastle disease virus isolates from pet birds. Acta Virol. 49 (3):177-82.
- 106.** *Shengqing Y, Kishida N, Ito H, Kida H, Otsuki K, Kawaoka Y, Ito T. 2002.* Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. Virology, 301: 206-211.
- 107.** *Shimabukuro I. 2000.* Determinación de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en psitácidas en cautiverio en el parque de las leyendas. Tesis de Médico Veterinario. Lima. Univ. Nac. Mayor San Marcos. Lima. 35 p.
- 108.** *Spradbrow P. 2000.* Epidemiology of Newcastle disease and the economics of its control. In: Proceedings of a Workshop on Poultry as a Tool in Poverty Eradication and

Promotion of Gender Equality (Dolberg F and Petersen P H, Eds.), Tune, Denmark, pp. 165-173

109. **Spadbrow P. 1993.** Newcastle disease in village chickens. Poult.Sci., Rev., 5:57-96.
110. **Stanislawek W, Wilks C, Meers J, Horner G, Alexander D, Manvell R, Kattenbelt J, Gould A. 2002.** Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. Arch Virol.147:1287–1302.
111. **Tadesse S, Ashenafi H, Aschalew Z. 2005.** Seroprevalence study of Newcastle disease in local chickens in central Ethiopia. Intern J Appl Res Vet Med; 3 (1): 25-29.
112. **Toro H, Hoerr F, Farmer K, Dykstra C, Roberts S, Perdue M. 2005.** Pigeon Paramyxovirus: Association with common avian pathogens in chickens and serologic survey in wild birds. Avian Dis. 49(1):92-98.
113. **Vargas J. 2003.** Patogenicidad y Respuesta Serológica de las Tórtolas (*Eupelia cruziana*) frente a un virus de la Enfermedad de Newcastle. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
114. **Villegas, P; Avellaneda, G. 1995.** Enfermedad de Newcastle. En: II Seminario Técnico Avícola – Simposio de Salmonella enteritidis, del 6 – 19 de mayo. Santa Cruz – Bolivia. p 161-165.
115. **Wakamatsu N, King D, Kapczynski D, Seal B, Brown C. 2006.** Experimental pathogenesis for chickens, turkeys, and pigeons of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002-2003. Veterinary Pathology, 43:925-933.

116. **Westbury H. 2001.** Newcastle disease virus-an evolving pathogen. *Avian Pathol.* 30: 5-11
117. **Wise M, Suarez D, Seal B, Pedersen J, Senne D, King D, Kapczynski D, Spackman E. 2004a.** Development of a real-time reverse transcriptase transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology.* Jan 2004. 329-358 p.
118. **Wise M, Seller H, Alvarez R, Seal B. 2004b.** RNA-dependent RNA polymerase gene analyses of worldwide Newcastle disease virus isolates representing different virulence types and their phylogenetic relation ship with other member of the Pramyxoviridae. *Virus Res.*, 104:71-80.
119. **Young M, Alders R. 2000.** Informe del taller sobre el control de la enfermedad de Newcastle en pollos de poblados. Instituto Nacional de Investigaciones Veterinarias – Mozambique. INFPD Newsletter vol. 10 N° 1 y 2. Ene – Jul 2000. [Internet], [03 febrero 2013]. Disponible en:
<http://www.fao.org/ag/aga/agap/lpa/fampo1/infpd101es.htm>
120. **Yu-Ping H, Hong-Liang C, Si-Yuan Y, Xiang-Wei Z, Ying S. 2005.** Primary survey of avian influenza virus and Newcastle disease virus infection in wild birds in some areas of Heilongjiang Province, China. *J. Vet Sci.* 6(4):311-315.
121. **Zhang S, Wang X, Zhao L, Liu D, Hu Y, Zhao J, Zhang G. 2011a.** Phylogenetic and Pathotypical Analysis of Two Virulent Newcastle Disease Viruses Isolated from Domestic Ducks in China. *PLoS ONE*, 6(9), e25000. Disponible en:
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025000>

122. **Zhang S, Zhao L, Wang X, Zhang D, Zhao J, Zhang G. 2011b.** Serologic and Virologic Survey for Evidence of Infection with Velogenic Newcastle Disease Virus in Chinese Duck Farms. *Avian Diseases Digest* 6(3):29-30.
123. **Ziedler K, Hlinak. 1993.** Detection of antibodies against Newcastle disease virus in wild birds. *Berl Munich Tierarztl. Wochenschr.* 106(9): 302-305.

VII. APÉNDICE

Apéndice 1: Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (OIE, 2009):

1. Con la ayuda de una micropipeta con tips descartables, colocar 25 ul de suero fisiológico tamponado en cada una de las celdillas de la microplaca.

2. Asimismo, con una micropipeta, adicionar 25 ul de las muestras de suero de las aves a cada una de las 11 celdillas de la primera hilera de cada placa, siempre dejando una para el control negativo.

3. Haciendo uso del microdilutor de 25 ul se mezcla el contenido y se pasa 25 ul a la segunda hilera de las celdillas; mezclando y volviendo a pasar a la tercera hilera, prosiguiendo así de manera sucesiva hasta el término de la microplaca, obteniendo diluciones seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, sucesivamente hasta 1:256.

4. Agregar posteriormente, 25 ul del antígeno conformado por el virus de la enfermedad de Newcastle con 4 unidades hemaglutinantes.

5. Dejar incubar a temperatura ambiente por 30 minutos para la obtención de la reacción antígeno-anticuerpo. Para finalizar, se añade 25 ul de glóbulos rojos al 0.75 % y se mezcla agitando bien las bandejas.

6. Dejar incubar las placas al medio ambiente por un periodo de 45 a 60 minutos. Pasado este periodo se procede a la lectura visual de los resultados. La aglutinación se mide mediante la inclinación de la microplaca. Solo se considera que muestran inhibición aquellas celdillas en las que los glóbulos rojos discurren de la misma manera que en la celdilla control.

7. Reacción positiva: Dada por la formación de botón en el fondo de la placa, compuesto por glóbulos rojos no aglutinados debido a la presencia de anticuerpos en el suero.

8. Reacción negativa: Esta dada por la formación de una malla en el fondo de la placa debido a la ausencia de anticuerpos en el suero, los cuales impiden la aglutinación de eritrocitos por el antígeno viral.

9. Se considera el título HI a la mayor dilución de suero que ocasiona una completa inhibición de 4HUA del antígeno.